

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS BIOLÓGICOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE
O CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO E DA MEDULA ÓSSEA
DE CÃES (*Canis lupus familiaris*)

MARTA CRISTINA THOMAS HECKLER

Botucatu - SP

Junho de 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS BIOLÓGICOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE O
CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO
TECIDO ADIPOSEO E DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES (*Canis lupus familiaris*)

MARTA CRISTINA THOMAS HECKLER

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim

Co-orientador: Prof. Fernanda da Cruz Landim

Nome do autor: Marta Cristina Thomas Heckler

Título: EFEITOS BIOLÓGICOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE O CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO E DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES (*Canis lupus familiaris*)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Profa. Assoc. Livre Docente Marimélia Porcionatto

Membro

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de São Paulo

Profa. Ass. Dra. Patrícia Fidelis de Oliveira Gregolini

Membro

Departamento de Fisiologia

Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Marjorie de Assis Golim

Membro

Hemocentro do Hospital de Clínicas
Faculdade de Medicina – UNESP - Botucatu

Profa. Adj. Dra. Regina Kiomi Takahira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 25 de junho de 2014.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram de alguma forma para este momento tão especial de minha vida profissional.

Gostaria de agradecer imensamente à Danielle Jaqueta Barberini e Diana Becerra pela ajuda ao longo do experimento, pelas conversas descontraídas e pela amizade. Ainda, aos colegas Denis Svicero, Diego Rodríguez e Lina Delgado pelo auxílio e amizade.

Aos colegas do laboratório LANÇA pela compreensão e amizade.

Agradeço também ao Prof. Dr. Rogério Martins Amorim e à Prof. Dra. Fernanda Landim por me aceitarem como orientada e co-orientada, respectivamente.

Agradeço à Laservet, juntamente com seus engenheiros, pela disponibilidade em ajudar e ceder o aparelho utilizado no estudo.

Ao Instituto Bioethicus na pessoa do Dr. Jean Joaquim pelo empréstimo do aparelho laser.

À Dra. Marjorie Golim e sua equipe (Aline, Mariana e Léa) e à Dra. Camila Dell'aqua pelas análises da citometria de fluxo e por toda ajuda fornecida.

À Profa. Dra. Lígia Mota e à Valquíria Cury por contrubuírem com as análises do cariótipo.

À Profa. Dra. Regina Takahira e aos residentes do Laboratório Clínico, agradeço pelos exames realizados.

Às Profas. Dra. Juliany Quitzan e Dra. Valéria Brandão, aos residentes da CCPA, CMPA e Reprodução Animal, que auxiliaram na colheita de material para o experimento. Obrigada pela ajuda e amizade!

À equipe do Prof. Dr. José Maurício Sforcin e do Prof. Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna agradeço o auxílio no experimento.

À equipe da Profa. Dra. Marimélia Porcionatto, principalmente à Taís e à Mayara, obrigada pelos ensinamentos e pela paciência.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Lourenço, Prof. Dr. Simone Chiacchio, Bianca Santarosa e Gabriela Dantas, agradeço a amizade e a oportunidade de trabalhar com vocês.

Aos cães que participaram do experimento, não tenho nem palavras para agradecer. Simplesmente, sem eles, este estudo não existiria.

A todos os meus amigos, em especial à Carla Ulian, Nadia Crosignani, Naiana Branchini, Maurício Wilmsen, Raíssa Salgueiro, Selene Babboni, Tália, Lidiane, Marília, Larissa, Patrícia, Andreza e Denise. Aos amigos distantes: Carla Machado, Daniella Sponchiado, Renata Ramos, Liliane Celita, Felipe Perez, Diana Rodriguez, Vanessa Bones e às amigas de sempre Caroline Rambo, Debora Dreher e Ana Luísa Diesel. Muito obrigada pela amizade de todos vocês, que foi essencial para que minha caminhada fosse bem mais alegre!

Ao meu namorado Álvaro pelo amor, carinho, dedicação e por estar sempre do meu lado e me estimular mesmo nos momentos difíceis.

À minha família, que me apoia incondicionalmente, mesmo que à distância, também não tenho palavras para agradecer. Mesmo com saudades, vocês sempre me deram força para correr atrás e alcançar todos os meus sonhos. E aqui está mais um deles!

À Deus, que sempre se manifesta em minha vida de maneiras maravilhosas e nos permite ter experiências tão ricas como a que concluo com este trabalho.

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 2

Tabela 1. Imunofenotipagem das CTM-TA e CTM-MO analisada pela técnica de citometria de fluxo.....	29
Tabela 2. Análise da apoptose das CTM-TA e CTM-MO.....	30

Capítulo 3

Tabela 3. Mediana (%) da viabilidade das CTM-TA e CTM-MO realizada por citometria de fluxo com as sondas anexina V (An+ representa marcação positiva e An- marcação negativa para anexina V) e iodeto de propídio (IP+ representa marcação positiva e IP- marcação negativa para iodeto de propídio).....	52
Tabela 4. Medianas da contagem celular total e viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripano das CTM-TA e CTM-MO dos grupos 1, 2 e 3.....	54
Tabela 5. Medianas do número de colônias e da eficiência de formação de colônias dos ensaios de UFC realizados nos grupos 1, 2 e 3 das CTM-TA e CTM-MO.....	56

Capítulo 4

Tabela 6. Contagem celular total das células irradiadas e não-irradiadas pela técnica de exclusão do azul de tripano.....	83
--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo 2	
Figura 1. Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM-TA e seus respectivos controles.....	25
Figura 2. Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM-MO e seus respectivos controles.....	26
Figura 3. Expressão dos marcadores de superfície CD34, CD45, CD44, CD90 e CD105 nas CTM-TA (acima) e CTM-MO (abaixo) pela técnica de citometria de fluxo.....	28
Figura 4. Expressão de anexina V e iodeto de propídio das CTM-TA e CTM-MO.....	29
Figura 5. Cariótipo normal das CTM-TA (A) e CTM-MO (B).....	30
Capítulo 3	
Figura 6. Delineamento experimental realizado em cada fonte de CTM.....	42
Figura 7. Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM-TA e CTM-MO.....	51
Figura 8. Gráficos da análise de apoptose celular com anexina V e IP.....	52
Figura 9. Expressão do MHC-II nas CTM-TA dos grupos 1, 2 e 3 (à esquerda) e das CTM-MO dos grupos 1, 2 e 3 (à direita).....	53
Figura 10. Demonstração da proliferação celular <i>in vitro</i> ao longo do tratamento dos grupos 1 (irradiadas com 1,1 J/cm ²), 2 (irradiadas com 8,7 J/cm ²) e 3 (controle) com laser de InGaAlP nos momentos primeiro, quarto e oitavo dia nas CTM-TA e o décimo dia nas CTM-MO (dia da avaliação).....	55
Figura 11. Colônias encontradas nos ensaios de UFC das CTM-TA do grupo 1 (irradiadas com 1,1 J/cm ²), 2 (irradiadas com 8,7 J/cm ²) e 3 (controle) (esquerda) e das CTM-MO do grupo 1 (irradiadas com 1,1 J/cm ²), 2 (irradiadas com 8,7 J/cm ²) e 3 (controle) (direita).....	57
Figura 12. Cariótipo normal das CTM-TA (A) e CTM-MO (B) caninas (2n=78).....	58

Capítulo 4

Figura 13. Diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica espontâneas das CTM-TA e CTM-MO mantidas em meio DMEM, SFB, antibiótico e antimicótico.....80

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1. Laser de baixa potência.....	4
1.2. Mecanismos de ação do LBP.....	5
1.3. Efeitos biológicos do laser sobre as células-tronco.....	7
CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico	
“Células-tronco mesenquimais caninas derivadas do tecido adiposo e da medula óssea possuem alta viabilidade e apresentam cariótipo normal durante expansão <i>in vitro</i> ”.....	18
Resumo.....	19
Introdução.....	20
Materiais e Métodos.....	21
Resultados.....	24
Discussão.....	30
Conclusão.....	32
Referências.....	32
Graphical Abstract.....	36
CAPÍTULO 3 – Trabalho Científico	
“Ausência de efeitos biológicos do laser de baixa potência sobre as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e da medula óssea de cães (<i>Canis lupus familiaris</i>)”.....	38
Resumo.....	38
1. Introdução.....	39
2. Materiais e Métodos.....	41
3. Resultados.....	50
4. Discussão.....	58
5. Conclusão.....	67
Referências.....	68

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL.....	78
CONCLUSÕES GERAIS.....	89
BIBLIOGRAFIA.....	91

HECKLER, M. C. T. **Efeitos biológicos do laser de baixa potência sobre o cultivo de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo e da medula óssea de cães (*Canis lupus familiaris*)**. Botucatu, 2014. 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O laser de baixa potência (LBP) é muito utilizado em diferentes ramos da medicina regenerativa e odontologia, onde é aplicado para melhorar o processo de cura e é benéfico em uma variedade de processos patológicos, no qual pode aumentar a taxa de proliferação de várias linhagens celulares. No entanto, poucos são os trabalhos que avaliaram os efeitos do LBP em células-tronco mesenquimais (CTM) caninas. Desta forma, os objetivos do presente trabalho são: caracterizar as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) e da medula óssea (CTM-MO) caninas, estudar o efeito do laser de baixa potência fosfato de índio-gálio-alumínio nas densidades de 1,1 e 8,7 J/cm² sobre o cultivo das mesmas quanto à proliferação e viabilidade celular, à imunogenicidade por meio da expressão do MHC-II e avaliar o cariótipo das células irradiadas e não irradiadas a fim de comprovar a ausência de alterações cromossômicas com a utilização do LBP. O estudo revelou que o LBP não alterou a viabilidade, proliferação celular, expressão de MHC-II e o cariótipo das amostras analisadas entre os grupos. Desta forma, pode-se concluir que o LBP não causa efeitos biológicos às CTM-TA e CTM-MO caninas nas dosagens utilizadas de 1,1 e 8,7 J/cm². Portanto, outras dosagens devem ser investigadas para estimular a proliferação das CTM caninas sem causar alterações celulares deletérias.

Palavras-chave: anexina V, antígenos CD, cariotipagem, citometria de fluxo, diferenciação celular, medicina veterinária, proliferação celular, viabilidade celular.

HECKLER, M. C. T. **Biological effects of low power laser on mesenchymal stem cells culture from canine (*Canis lupus familiaris*) adipose tissue and bone marrow.** Botucatu, 2014. 108p. Tese (Doutorado) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University.

ABSTRACT

Low power laser (LPL) is widely used in different fields of regenerative medicine and dentistry, where it is used to improve the healing process and is beneficial in a variety of disease processes, which can increase the rate of proliferation of various cell lineages. However, there are few studies evaluating the effects of LPL on canine mesenchymal stem cells (MSC). Thus, the aims of this study are: to characterize canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (AT-MSC) and bone marrow (BM-MSC), to investigate the effect of low power laser aluminium gallium indium phosphide at densities of 1.1 and 8.7 J/cm² on cellular viability and proliferation, immunogenicity by MHC-II expression and evaluate the karyotype of the irradiated and non-irradiated cells in order to identify the absence of chromosomal abnormalities with the use of LPL. The study revealed that LPL did not affect cell viability and proliferation, MHC-II expression and karyotype of the samples analyzed between groups. Thus, we can conclude that LPL cause no biological effects to canine AT-MSC and BM-MSC with the 1.1 and 8.7 J/cm² dosages used. Therefore, other dosages to stimulate proliferation without causing deleterious cellular changes of canine MSC must be investigated.

Keywords: annexin V, CD, karyotyping, flow cytometry, cell differentiation, veterinary medicine, cell proliferation, cell survival.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A pesquisa de células-tronco mesenquimais (CTM) é um campo que está crescendo rapidamente na medicina humana e veterinária. Estas células foram primeiramente identificadas na medula óssea, mas desde então têm sido encontradas em uma grande variedade de tecidos, inclusive no tecido adiposo. Este último tem ganhado atenção por ser uma fonte abundante de CTM em locais acessíveis e em maior concentração que na medula óssea. O procedimento cirúrgico para extração de tecido adiposo pode ser feito rapidamente e com mínima morbidade ao paciente, quando comparado com outras fontes de CTM, o que é especialmente importante em pacientes idosos, que necessitam um tempo anestésico e de recuperação mais curtos (ASTOR *et al.*, 2013).

Além disso, alguns estudos demonstraram que as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) tiveram maior capacidade multipotencial que outros tecidos, como a medula óssea e o sangue do cordão umbilical (ASTOR *et al.*, 2013).

As CTM-TA são morfologicamente semelhantes às CTM da medula óssea (CTM-MO) ou de outro tecido após serem cultivadas *in vitro* (CHENG *et al.*, 2011).

No entanto, as CTM-MO ou células estromais multipotentes são as células-tronco adultas que foram melhor caracterizadas até hoje, além de possuírem capacidade multipotencial (CHENG *et al.*, 2011).

As CTM têm despertado muito interesse de pesquisadores devido ao seu potencial uso na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos, pois estudos pré-clínicos e clínicos demonstram o valor terapêutico de tais células (BARRY e MURPHY, 2004).

Um número adequado de CTM é requerido para aplicações clínicas porque a eficácia das células-tronco é limitada no microambiente patológico do hospedeiro, mesmo quando transplantadas em número muito elevado (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

A cultura celular é uma das técnicas mais úteis na ciência, particularmente na produção de vacinas virais e de linhagens celulares híbridas. No entanto, a

taxa de crescimento de algumas células de mamíferos é muito lenta (ALGHAMDI *et al.*, 2012). Dependendo da indicação terapêutica, o uso das células-tronco pode ser mais vantajoso devido à abundância, frequência e potencial de expansão das células, do que na sua capacidade de diferenciação celular (KERN *et al.*, 2006). Desta forma, o laser de baixa potência (LBP) pode aumentar a taxa de proliferação de várias linhagens celulares, tais como CTM, fibroblastos, queratinócitos, linfócitos, células endoteliais e do epitélio olfativo (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002; ALGHAMDI *et al.*, 2012). A fototerapia com LBP em nível celular tem sido alvo de vários estudos ao longo dos anos (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002).

Os princípios necessários ao desenvolvimento do raio laser (“light amplification by stimulated emission of radiation” ou amplificação de luz por emissão estimulada de radiação) surgiram no início do século 20 e, desde então, grande parte do progresso na tecnologia do laser seguiu a pesquisa de armas ou aplicações comerciais nos setores de comunicação e da indústria. Após o término da guerra fria, os fabricantes de laser, antes dedicados a aplicações militares, tomaram iniciativas para o avanço da tecnologia do laser na área médica (BARTELS, 2002).

O LBP tem sido usado nos últimos 30 anos para a cicatrização de feridas. Também é muito utilizado em diferentes ramos da medicina regenerativa e odontologia, onde é aplicado para melhorar o processo de cura. Ele é benéfico em uma variedade de processos patológicos, incluindo alívio da dor e inflamação, e pode contribuir para a normalização da função hormonal anormal, estimulação da liberação de endorfinas, modulação do sistema imune, aumento da microcirculação, melhora na oxigenação, nutrição e regeneração celular (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

Portanto, este estudo visa caracterizar as CTM-TA e CTM-MO caninas, estudar o efeito do laser de baixa potência fosfato de índio-gálio-alumínio nas densidades de 1,1 e 8,7 J/cm² sobre o cultivo das mesmas quanto à proliferação e à viabilidade celular, à imunogenicidade por meio da expressão do MHC-II e avaliar o cariótipo das células irradiadas e não irradiadas a fim de comprovar a ausência de alterações cromossômicas com a utilização do LBP.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Laser de baixa potência:

O laser é uma forma de radiação eletromagnética no espectro visível ou próximo a ele (BAXTER e McDONOUGH, 2007) e surgiu de pesquisas de Einstein em 1917 nos princípios físicos de emissão de luz estimulada (SILVA *et al.*, 2010).

A laserterapia de baixa intensidade, também conhecida como laserterapia de baixo nível, bioestimulação do laser, ou simplesmente laserterapia, pode ser definida como o uso de fontes de LBP e de diodos superluminosos para o tratamento de condições médicas (BAXTER e McDONOUGH, 2007).

Para a irradiação com o LBP, utiliza-se o laser vermelho ou próximo ao infravermelho com comprimentos de onda de 600 a 1.100 nm e uma potência de saída entre 1 e 500 mW. Tem sido utilizado ainda com luz ultravioleta ou infravermelha, mas os resultados mais efetivos foram verificados pelo uso do espectro visível, variando de 600 a 700 nm. É uma onda contínua ou luz pulsada que consiste em um feixe constante de relativamente baixa energia (0,04 a 50 J/cm²) e o laser é direcionado ao tecido alvo ou células em monocamada usando potências medidas em miliwatts. Os laser utilizados em cultivos celulares são, principalmente, o hélio neônio (HeNe) e o arseneto de alumínio e gálio (AsAlGa) (ALGHAMDI *et al.*, 2012). Porém, existem diversos outros tipos de laser usados em áreas médicas, como o laser de dióxido de carbono (10600 nm), arseneto de gálio e índio (780-980 nm), neodímio itrio-alumínio-granate (Nd:YAG) (1064 nm), fosfato de titânio e potássio (532 nm), laser de argônio (458 e 524 nm), de rubi (694 nm), de hólmio (2100 nm), de érbio (2900 nm) e laser de corante (400 a 1000 nm) (BARTELS, 2002).

Os aparelhos modernos de tratamento com laser baseiam-se em uma única (estilo caneta) ou múltiplas unidades de diodo. A potência de saída é especificada em miliwatts e fixada pela seleção do tratamento (BAXTER e McDONOUGH, 2007). Também há relato de aparelhos adaptados e automatizados para o uso em pesquisas, que minimizam o tempo gasto pelo operador e possíveis erros da irradiação manual (LINS *et al.*, 2013; TIMBERLAKE e ENWEMEKA, 2004).

Unidades de controle permitem ajustar os parâmetros de tratamento, que devem incluir tempo de irradiação e frequência de pulso. O tempo de irradiação ou de tratamento é importante para determinar a dosagem do tratamento, ou seja, a energia aplicada, que é medida em Joules (J). Ainda, pode-se mensurar a densidade de energia, que é dada em J/cm². A frequência de pulso também pode ser selecionada em alguns aparelhos (BAXTER e McDONOUGH, 2007).

O LBP transmite energia a níveis baixos e, portanto, não emite calor, som ou vibrações. Suas reações não são térmicas porque não há um aumento imediato da temperatura do tecido irradiado (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

A segurança da laserterapia já é bem estabelecida no tratamento em seres humanos (BAXTER e McDONOUGH, 2007). Para a irradiação das células, alguns cuidados devem ser tomados, como irradiar as células no escuro e substituir o meio de cultivo por solução tampão de fosfato. Caso contrário, o soro pode interferir com a reação durante a irradiação (TUBY *et al.*, 2007).

1.2. Mecanismos de ação do LBP:

Os efeitos do LBP no metabolismo tecidual são conhecidos como bioestimulação do laser. A bioestimulação *in vitro* sofre influência de vários fatores, por exemplo, os parâmetros de irradiação do laser como comprimento de onda, potência de saída e densidade de energia, bem como o tipo de célula irradiada. Portanto, é possível que células em tecidos não respondam ao LBP da mesma forma que em cultivos celulares e que parâmetros semelhantes possam ter efeitos diferentes em diferentes tipos celulares (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

Embora os mecanismos biológicos subjacentes aos efeitos bioestimulatórios ainda não sejam totalmente conhecidos, muitos investigadores relatam que ele modula processos metabólicos celulares, levando a um aumento do potencial regenerativo para tecidos biológicos. Apesar disso, efeitos bioestimulatórios positivos do LBP nos tecidos são bem conhecidos (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado efeitos bioestimulatórios como cicatrização de feridas, proliferação condral, de fibroblastos, de queratinócitos, de células uroteliais e endoteliais, de mioblastos e de outros tipos celulares, síntese de

colágeno, atividade anti-inflamatória, regeneração de nervos, produção de matriz óssea, síntese proteica, síntese de ATP, DNA e RNA, estímulo à diferenciação celular e aumento da expressão de fatores de crescimento e citocinas (ABRAMOVITCH-GOTTLIB *et al.*, 2005; ALEXANDRATOU *et al.*, 2002; ALGHAMDI *et al.*, 2012).

O mecanismo básico de ação do LBP é a absorção da luz no tecido irradiado por biomoléculas específicas conhecidas como cromóforos, tipicamente encontrados dentro das mitocôndrias. Baseada nesta absorção, a energia luminosa é transformada em energia bioquímica. Após esta absorção inicial, há uma série de reações secundárias que resultam na modulação de funções celulares e o estímulo de mecanismos de reparação tecidual. Portanto, a absorção da luz é a chave para a efetividade da laserterapia. Deve-se compreender que a absorção do tecido é mais importante que a penetração do tecido, frequentemente citado em termos de milímetros (BAXTER e McDONOUGH, 2007).

Os estudos sugerem que o espectro de luz vermelha e infravermelha leva à excitação eletrônica de componentes da cadeia respiratória mitocondrial, estimulando a proliferação e a citoproteção (KARU, 1999). A estimulação do laser pode produzir baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio por meio da absorção da luz pelas porfirinas endógenas ou pelos citocromos na mitocôndria (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002). As evidências têm demonstrado que a citocromo-c oxidase é um fotorreceptor chave para o espectro de luz vermelho e infravermelho, através da absorção da luz pelos íons cobre, nos quais esta enzima é rica (KARU *et al.*, 2005).

Com a absorção da irradiação, ativa-se o transporte de elétrons na cadeia respiratória e a ocorrência do processo de oxidação, levando a mudanças no estado redox tanto da mitocôndria, quanto do citoplasma, o que pode afetar a permeabilidade de membrana e determinar mudanças na proporção Na^+/H^+ , aumentando os níveis de Na^+ , na atividade da K^+/ATPase e interferindo no fluxo de íons cálcio, envolvido na produção de nucleotídeos, os quais modulam a síntese de DNA e RNA e, finalmente, a proliferação celular (KARU *et al.*, 2005).

O LBP melhora a proliferação celular sem causar efeitos citotóxicos. A proliferação celular é um efeito biológico importante que é utilizado em procedimentos de cultivos celulares experimentais básicos e na prática clínica (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

No entanto, foi observado um efeito inibitório a níveis mais elevados de energia (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002), ressaltando o efeito dose-dependente das respostas biológicas após a exposição luminosa. A maioria dos estudos sugere que a bioestimulação ocorre em densidades de energia entre 0,05 e 10 J/cm², enquanto doses acima de 10 J/cm² possuem efeitos bioinibitórios. Outro estudo sugere que densidades de 0,5 J/cm² a 4 J/cm² e um espectro de 600 a 700 nm são muito úteis no aumento da proliferação de várias linhagens celulares (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

Como citado, uma dose-resposta bifásica tem sido frequentemente observada no LBP, onde este tem um efeito muito melhor no estímulo e reparação teciduais do que em níveis mais altos de laser. A chamada curva de Arndt-Schulz é frequentemente usada para descrever esta dose-resposta bifásica (HUANG *et al.*, 2009).

No entanto, mais pesquisas devem ser realizadas para investigar os processos fotoestimulatórios mais profundamente em relação à proliferação celular (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002).

1.3. Efeitos biológicos do laser sobre as células-tronco:

A terapia com as CTM é um procedimento promissor para o tratamento de diversos tipos de doenças degenerativas (ZAGO e COVAS, 2006). Com o uso apropriado do LBP, a taxa proliferativa das células cultivadas, incluindo as células-tronco, pode ser aumentada, o que é muito útil na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa (ALGHAMDI *et al.*, 2012). Desta forma, Hou *et al.* (2008) utilizaram o LBP de 635 nm para melhorar a taxa de proliferação das CTM-MO de ratos com várias densidades de energia. Eles verificaram maior proliferação nos grupos irradiados do que nos grupos não irradiados, com melhores resultados na densidade de 0,5 J/cm². Ainda, verificaram aumento na secreção de fatores de crescimento e maior diferenciação

miogênica com 5 J/cm² e não detectaram diferenças de efeitos citotóxicos entre os grupos.

A irradiação com luzes de comprimentos de onda de 415, 602, 632, 650 e 720 nm também acelerou a síntese de ATP em um estudo, enquanto luzes de 477, 511 e 554 não tiveram nenhum efeito (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002).

O LBP pode prevenir a apoptose celular e melhorar a proliferação, migração e adesão celular a níveis baixos de iluminação com luz vermelha ou próximo à infravermelha (ALGHAMDI *et al.*, 2012). Além disso, causa aumento do pH intracelular, que está associado à supressão da apoptose e ao controle da taxa de progressão do ciclo celular (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002).

Células-tronco derivadas do tecido adiposo humano também já foram irradiadas com laser de diodo a um comprimento de onda de 635 nm e densidade de energia de 5 J/cm². Foi verificado um aumento na proliferação nas células irradiadas, em comparação com o grupo controle (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

Barboza e colaboradores (2014) verificaram o aumento da proliferação de CTM-MO e CTM-TA irradiadas em 2 sessões de 0,5 e 1 J/cm², sendo que as últimas responderam melhor que as primeiras, e a densidade de 1 J/cm² foi mais eficiente para ambos os tipos celulares em 24h e 72h após a irradiação.

A irradiação de CTM-MO de equinos com LED nos comprimentos de onda de 630 ± 10 nm e 850 ± 10 nm e densidade de energia de 6,5 J/cm² por 3 dias resultou em aumento da proliferação celular com os grupos irradiados apresentando quantidade de células 5,5 e 14,3% maiores que o grupo controle (VELOSO *et al.*, 2011).

Já em outro estudo, as CTM-MO de camundongos não apresentaram diferenças quanto à proliferação e à diferenciação celular em osteoblastos e osteoclastos com o uso do LBP de 808 nm e densidade de energia de 4 J/cm² (BOUVET-GERBETTAZ *et al.*, 2009).

Foi relatado que o laser de arseneto de gálio com comprimento de onda de 804 nm aumentou a proliferação de CTM e cardiomiócitos, sem efeitos adversos nas células e não causou nenhuma mudança histopatológica nas células-satélite miogênicas em cultivo. Deste modo, as densidades de energia de 1 e 3 J/cm² empregadas neste estudo podem ser utilizadas com segurança

para a irradiação das células *in vitro*. Estes resultados podem ter um impacto importante na medicina regenerativa (TUBY *et al.*, 2007).

As CTM, também conhecidas como células-tronco estromais, células progenitoras medulares e células-tronco adultas derivadas da medula óssea, representa uma população heterogênea de células semelhantes a fibroblastos, que podem ser encontradas no estroma da medula óssea (ATOUI e CHIU, 2012) e outros tecidos (ZAGO e COVAS, 2006). Com relação às células precursoras multipotentes derivadas do estroma do tecido adiposo, existe uma inconsistência na nomenclatura utilizada na literatura para descrevê-las, podendo ser citadas como células processadas de lipoaspiração, células estromais derivadas do tecido adiposo, pré-adipócitos, fração celular vascular estromal de tecido adiposo, entre outros. O termo fração vascular estromal descreve as CTM-TA obtidas imediatamente após a digestão com a enzima collagenase (CHENG *et al.*, 2011).

Elas apresentam inúmeros marcadores imunofenotípicos. Entretanto, estes marcadores não são específicos, ocorrendo em outros tipos celulares. Tem sido feito um esforço considerável para identificar marcadores específicos que permitam a identificação e o isolamento de CTM. Desta forma, embora não existam anticorpos exclusivos para as CTM, a análise com um conjunto de anticorpos mais expressos nestas células permite determinar um perfil imunofenotípico das CTM expandidas em cultivo e consiste em um dos critérios estabelecidos para definí-las, segundo a Sociedade Internacional para Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006; ZAGO e COVAS, 2006). Diferente das células hematopoiéticas, elas são CD34 e CD45 negativas. Alguns outros marcadores típicos são CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD124, SH2 e SH3 (ATOUI e CHIU, 2012).

Embora a extensão da plasticidade das CTM ainda esteja sob investigação, os estudos dos últimos anos têm demonstrado a capacidade das CTM diferenciarem-se em células de diferentes linhagens. Sua plasticidade tem gerado muito entusiasmo, levantando esperanças para seu uso terapêutico em uma grande gama de doenças, já que estas células não possuem problemas éticos ou de tumorigenicidade como as células embrionárias (ATOUI e CHIU,

2012). Elas possuem relevante capacidade plástica, sendo capazes de originar diversos tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (ZAGO e COVAS, 2006).

Além da alta capacidade de replicação, as CTM podem facilmente serem coletadas da medula óssea, expandidas e diferenciadas (ATOUI e CHIU, 2012) em várias formas mesenquimais, como músculo, cartilagem, osso e tecido adiposo (BAKSHI *et al.*, 2004). A diferenciação das CTM é controlada por fatores presentes nos tecidos após seu transplante (BONAB *et al.*, 2007), podendo ainda serem diferenciadas *in vitro* (CASTANHEIRA *et al.*, 2009).

A diferenciação osteogênica requer a presença de indutores que incluem o betaglicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença destas substâncias, as CTM adquirem morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular rica em cálcio (BARRY e MURPHY, 2004).

A diferenciação condrogênica ocorre quando as CTM são cultivadas em ambiente tridimensional em meio livre de soro fetal bovino e na presença de TGF- α . Nestas condições, as CTM rapidamente mudam a sua morfologia fibroblastoide característica e passam a secretar glicosaminoglicanos, agreganos, fibromodulina, proteína oligomérica da matriz cartilaginosa, decorina, colágeno tipo II e condroaderina, que são componentes da matriz cartilaginosa normal (BARRY *et al.*, 2001; BARRY e MURPHY, 2004).

A diferenciação adipogênica ocorre quando a monocamada celular é cultivada na presença de isobutilmetilxantina. Nestas condições, ocorre ativação do gene PPAR γ (peroxissome proliferator-activated receptor-gamma) e sintetase de ácidos graxos. As células assim cultivadas rapidamente acumulam gotículas de lipídeos no citoplasma (BARRY e MURPHY, 2004).

Foi descrito que as CTM humanas cultivadas em presença de 5-azacitidina diferenciam-se em miócitos (WAKITANI *et al.*, 1995).

As CTM são facilmente isoladas da medula óssea porque se aderem na superfície plástica e podem ser multiplicadas em cultura nas quantidades desejáveis (BRENNEMAN *et al.*, 2010). Além da medula óssea, as CTM podem ser obtidas de uma grande variedade de tecidos, como por exemplo do sangue do cordão umbilical, da veia umbilical, da veia safena, da parede de artérias, do fígado e pâncreas fetais, da placenta, do tecido adiposo, da retina, das

gônadas e da polpa dentária (ABEDIN *et al.*, 2004; CAMPAGNOLI *et al.*, 2001; COVAS *et al.*, 2003; 2005; DISSANAYAKA *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2003; JIN *et al.*, 2003; KERN *et al.*, 2006; MACIAS *et al.*, 2010; ZAGO e COVAS, 2006).

Ainda, as CTM podem se diferenciar em linhagens não-mesenquimais, como as células neurais, em um processo chamado transdiferenciação. No entanto, seus mecanismos permanecem desconhecidos e sua ocorrência ainda é tema de debate (BARBA *et al.*, 2013; CASTANHEIRA *et al.*, 2009).

Neste contexto, as CTM estão sendo testadas para o tratamento de doenças cardíacas, lesões ósseas, condrais, tendíneas, pulmonares, do sistema nervoso central, do fígado e em doenças genéticas (BARRY e MURPHY, 2004; ZAGO e COVAS, 2006).

O tecido adiposo também é uma abundante e acessível fonte de CTM capaz de fornecer um grande número de células necessárias para a utilização em terapias celulares (GIMBLE e GUILAK, 2003). Carvalho *et al.* (2009) relataram que as CTM provenientes do tecido adiposo de equinos apresentam isolamento, cultivo e imunofenotipagem viáveis. Mambelli *et al.* (2009) confirmaram que, mesmo após sua criopreservação, estas células permanecem com o seu potencial proliferativo e capacidade de diferenciação inalterados.

No estudo de Kern *et al.* (2006), as CTM derivadas da medula óssea, tecido adiposo e sangue do cordão umbilical apresentaram morfologia fibroblastoide, formação de unidades formadoras de colônia (UFC), capacidade de diferenciação multipotencial e expressão de proteínas de superfície típicas. Eles afirmam que, tanto a medula óssea quanto o tecido adiposo, são fontes confiáveis para o isolamento e expansão das CTM em ensaios autólogos, já que todas as preparações dão origem a este tipo celular (KERN *et al.*, 2006).

Os ensaios de UFC fornecem um meio conveniente de avaliar a capacidade proliferativa que retêm as CTM após as células serem expandidas em cultivo (PEISTER *et al.*, 2004). Geralmente, cada colônia no ensaio surge de uma única célula. Portanto, o número de UFC obtidas provavelmente reflete o número de CTM ou precursores de CTM em uma amostra de medula óssea. Em amostras com baixos números de CTM formadoras de colônias, as células provavelmente sofreram muitas duplicações antes de atingir confluência na

primeira passagem e, portanto, têm um potencial limitado para maior expansão (DIGIROLAMO *et al.*, 1999).

Recentemente, houve um avanço enorme no conhecimento das células-tronco adultas para seu uso como células doadoras em terapias regenerativas. Associado a esses avanços, surgiram alguns achados inesperados e controversos que desafiam dogmas científicos atuais. Um dos dilemas é uma série de observações indicando que as CTM são privilegiadas imunologicamente, aptas a sobreviver e diferenciar em transplantes alogênicos e até mesmo xenogênicos (ATOUI e CHIU, 2012).

Estudos sugerem que o transplante alogênico de CTM poderia não ser rejeitado na ausência de imunossupressão. Estudos em modelos animais têm fornecido evidências em favor desta hipótese (DEVINE *et al.*, 2003). Esta hipoinmunogenicidade tem grandes implicações na terapia alogênica e existem muitos relatos descrevendo o uso clínico de células alogênicas com pouca evidência de rejeição imune pelo hospedeiro ou doença do enxerto contra hospedeiro (BARRY e MURPHY, 2004).

Tal imunogenicidade baixa é devida à ausência do antígeno leucocitário de classe II (MHC-II) e de moléculas co-estimulatórias como o CD40, CD80 e CD86 (BONAB *et al.*, 2007). Em condições basais, as CTM não expressam MHC-II, mas passam a expressar esta molécula após estimulação com interferon alfa. Com este fenótipo, seria esperado que as CTM estimulassem a proliferação das células T, o que levaria à rejeição de CTM de doadores. Entretanto, inúmeros estudos realizados por diferentes laboratórios mostraram que isto não acontece e que as CTM, em realidade, inibem a proliferação de células T (DiNICOLA *et al.*, 2002). O MHC-II também está ausente da superfície de CTM diferenciadas e estas células também não causam uma resposta proliferativa dos linfócitos (BARRY e MURPHY, 2004).

Nos últimos anos, um número cada vez maior de experimentos apontam para propriedades imunomoduladoras das CTM em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Uma intrigante propriedade é sua habilidade de escapar ao reconhecimento imune e até mesmo inibir respostas imunes ativamente (ATOUI e CHIU, 2012).

Os mecanismos desta imunotolerância são objetos de intenso estudo, e três mecanismos interrelacionados têm sido citados. As CTM aparentam não

causar rejeição por (1) serem hip imunogênicas, (2) modularem o fenótipo das células T e (3) imunossuprimirem o ambiente local (ATOUI e CHIU, 2012).

Apesar das evidências de estudos *in vitro* demonstrarem as propriedades imunomoduladoras das CTM, sua importância nos ensaios *in vivo* continuam controversas. Ainda assim, o uso das CTM já foi introduzido à prática clínica, especialmente nos campos da hematologia e doenças auto-imunes (ATOUI e CHIU, 2012).

Durante a resposta imune adquirida, diversas porções do organismo invasor são processadas e apresentadas às células antígeno-sensitivas do sistema imune. Esta apresentação envolve a quebra do antígeno estranho em pequenos fragmentos, e a colocação destes fragmentos em locais específicos da superfície celular dos receptores. O sistema imune somente responde a esta apresentação apropriada de antígeno (TIZARD, 2000).

Para desencadear a resposta imune, além da fragmentação do antígeno no interior das células, é necessário adaptar estes fragmentos em uma molécula apresentadora de antígeno. Estas moléculas são chamadas de moléculas de histocompatibilidade, que são receptores glicoprotéicos especializados codificados por genes localizados em um complexo chamado de complexo de histocompatibilidade principal (MHC, na sigla em inglês) (TIZARD, 2000).

O MHC pode ser considerado um feixe de genes que controla o processamento e apresentação do antígeno. Cada MHC contém três classes de genes, os da classe I codificam as moléculas de MHC encontradas na maioria das células nucleadas. Os da classe II codificam as moléculas de MHC da superfície das células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas e células B). Os MHC da classe III apresentam o antígeno para as proteínas do sistema complemento (TIZARD, 2000).

A principal função do MHC-II é apresentar antígenos processados, que são derivados primariamente de fontes exógenas, aos linfócitos T CD4+, sendo cruciais para a iniciação da resposta imune antígeno-específica. Além da apresentação de antígenos, estudos mostram que a ligação das moléculas MHC-II também ativam meios de sinalização intracelular, levando à apoptose (HOLLING *et al.*, 2004). O MHC classe I apresenta antígenos oriundos do meio intracelular aos linfócitos T CD8+ (TIZARD, 2000).

Além de sua propriedade hipoinmunogênica, a viabilidade das CTM é importante para permitir sua migração e implantação após transplantes. Neste sentido, alguns estudos vêm pesquisando formas de aprimorar a sobrevivência celular (BHAKTA *et al.*, 2006).

A avaliação da viabilidade ou morte celular pode ser realizada utilizando-se o ensaio de citometria de fluxo com anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o iodeto de propídio (IP). Este método permite a discriminação entre células apoptóticas e necróticas (BURAVKOVA *et al.*, 2013).

A apoptose é associada a mudanças morfológicas e bioquímicas características, incluindo retração celular, formação de prolongamentos da membrana, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e mudanças na superfície celular. Várias técnicas foram desenvolvidas para mensurar a fragmentação do DNA, um evento tardio da apoptose. No entanto, a detecção precoce da apoptose é crítica para o estudo da via central que leva à esse processo (BOSSY-WETZEL e GREEN, 2000).

Desta forma, o ensaio com anexina V é baseado na observação da translocação da fosfatidilserina (FS), um fosfolípido que normalmente encontra-se confinado à superfície citoplasmática da membrana plasmática, para a superfície celular durante a apoptose na maioria dos tipos celulares e por muitos estímulos apoptóticos. A externalização da FS à superfície celular marca as células apoptóticas para serem reconhecidas pelas células vizinhas ou macrófagos, facilitando a remoção não-inflamatória das células em processo de morte por fagocitose. Uma vez na superfície celular, a FS pode ser detectada pela ligação com a anexina V marcada com FITC (BOSSY-WETZEL e GREEN, 2000).

A proteína da anexina V pertence a uma família de proteínas de ligação de fosfolípidos que se liga especificamente, na presença do cálcio, a fosfolípidos carregados negativamente, como a FS. As células positivas para anexina V marcada com FITC podem ser detectadas por citometria de fluxo ou por microscopia de fluorescência. Também é possível o uso da anexina V em combinação com outros corantes, como o IP e o Hoechst 33342, que permitem a caracterização de estágios avançados da apoptose. Na maioria dos casos, a translocação da FS à superfície celular ocorre antes da condensação do DNA,

permeabilização da membrana plasmática e formação dos prolongamentos da membrana servindo, portanto, como uma medida rápida e conveniente da apoptose precoce (BOSSY-WETZEL e GREEN, 2000).

A translocação da FS não é única da apoptose, mas também ocorre durante a necrose celular. A diferença entre essas duas formas de morte é que, durante as fases iniciais da apoptose, a membrana celular permanece intacta, enquanto que no mesmo momento que a necrose ocorre, a membrana celular perde sua integridade e se torna permeável. Portanto, a mensuração da ligação da anexina V à superfície celular como indicador de apoptose deve ser realizada em conjunto com um teste de exclusão de corante para estabelecer a integridade da membrana celular, como por exemplo, o IP (VERMES *et al.*, 1995), o qual detecta esta perda da integridade da membrana celular (SPAN *et al.*, 2002).

As características inerentes às CTM tornam-as muito atrativas para seu uso na terapia celular e na medicina regenerativa. No entanto, sua segurança *in vivo*, incluindo a toxicidade e tumorigenicidade também devem ser estudadas (RA *et al.*, 2011).

Um trabalho com CTM-TA humanas avaliou sua estabilidade genética ao longo do cultivo *in vitro*. Verificou-se que o cariótipo das CTM-TA manteve-se normal por, pelo menos, 12 passagens (RA *et al.*, 2011). Outro estudo também verificou estabilidade genética e cariótipo normal em CTM derivadas de placenta humana entre a 15^a e a 20^a passagens (MACIAS *et al.*, 2010). No entanto, outro estudo com CTM do sangue do cordão umbilical demonstrou várias anormalidades cariotípicas, com múltiplas alterações numéricas e estruturais (MANCA *et al.*, 2008).

A análise do cariótipo é utilizada para identificar marcadores cromossômicos, o gênero e a espécie animal e para analisar o número característico de cromossomos de determinada espécie e determinar aneuploidia em linhagens celulares. É um método sensível e fornece informações importantes na confirmação da identidade celular (MACHADO *et al.*, 2014).

A cariotipagem é suficiente para identificar alguma alteração estrutural ou numérica dos cromossomos se uma grande área do DNA é afetada (RA *et al.*, 2011).

O cão (*Canis lupus familiaris*) possui o maior número de cromossomos diploides dos animais domésticos, com um cariótipo de 38 autossomos e dois cromossomos sexuais ($2n=78$), sendo todos os autossomos acrocêntricos. Até recentemente, esse cariótipo era pouco compreendido, pelo grande número de cromossomos, de seu tamanho e da ausência de um padrão claro de bandas R. No entanto, algumas técnicas como a hibridização *in situ* fluorescente auxiliaram na compreensão e descrição do cariótipo canino e de outros canídeos (GALIBERT e ANDRÉ, 2008; SARGAN *et al.*, 2000).

Com o exposto, pode-se afirmar que o número de trabalhos científicos envolvendo CTM cresce exponencialmente, porém muito ainda existe para ser feito neste campo e no campo mais genérico das terapias celulares (ZAGO e COVAS, 2006).

CAPÍTULO 2

Trabalho a ser enviado para a revista “Current Stem Cell Research and Therapy”

Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e da medula óssea de cães possuem alta viabilidade e apresentam cariótipo normal durante expansão *in vitro*

Resumo: As células-tronco mesenquimais (CTM) têm despertado muito interesse de pesquisadores devido ao seu potencial uso na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos, pois estudos pré-clínicos e clínicos demonstram o valor terapêutico de tais células. Além de sua propriedade hipoinmunogênica, a viabilidade das CTM é importante para permitir sua migração e implantação após transplantes. Neste sentido, alguns estudos vêm pesquisando formas de aprimorar a sobrevivência celular. Além disso, a cariotipagem é um método sensível, fornece informações importantes na confirmação da identidade celular e é suficiente para identificar alguma alteração estrutural ou numérica dos cromossomos se uma grande área do DNA é afetada. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é verificar a apoptose e o cariótipo de CTM do tecido adiposo e da medula óssea de cães. Para as análises, foram utilizadas 10 amostras, sendo coletadas 5 amostras de tecido adiposo e 5 amostras da medula óssea caninas. Após o cultivo, as CTM demonstraram viabilidade de 96,5% em ambos os grupos e cariótipo diploide normal, sem alterações estruturais ou numéricas. Portanto, as CTM caninas provenientes do tecido adiposo e da medula óssea apresentaram alta viabilidade e estabilidade cromossômica durante seu cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: anexina V, antígenos CD, células estromais, citometria de fluxo, cariotipagem, propídio, veterinária.

INTRODUÇÃO

Uma nova abordagem para o tratamento de lesões tem sido realizada nos últimos anos com o uso de células com capacidade de auto-renovação e de diferenciação, como as células progenitoras, as células-tronco mesenquimais (CTM) e as células-tronco hematopoéticas [1].

As CTM têm despertado muito interesse de pesquisadores devido ao seu potencial uso na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos, pois estudos pré-clínicos e clínicos demonstram o valor terapêutico de tais células [2]. Neste sentido, a imunofenotipagem, o potencial de diferenciação, a viabilidade e a citogenética são aspectos importantes a serem estudados. Os estudos pré-clínicos são passos importantes para aumentar a compreensão da biologia das células-tronco e possuem uma importante função de prever a eficácia das CTM [3].

As células-tronco adultas que melhor foram caracterizadas até hoje e que se considera terem capacidade multipotencial são as CTM da medula óssea (CTM-MO) ou células estromais multipotentes humanas. No entanto, além da medula óssea, o sangue do cordão umbilical e a gordura também têm sido utilizados para isolamento e expansão de CTM. As CTM do tecido adiposo (CTM-TA) compartilham de propriedades imunossupressoras com as CTM-MO e, portanto, podem representar uma fonte alternativa para a terapia com células-tronco [1]. Este tecido tem ganhado atenção por ser uma fonte abundante de CTM em locais acessíveis e em maior concentração que na medula óssea. O procedimento cirúrgico para extração de tecido adiposo pode ser feito rapidamente e com mínima morbidade ao paciente, quando comparado com outras fontes de CTM, o que é especialmente importante em pacientes idosos, que necessitam um tempo anestésico e de recuperação mais curtos [4]. Em medicina veterinária, a medula óssea e o tecido adiposo representam as fontes mais importantes de CTM [5].

As CTM podem contribuir para a regeneração tecidual diretamente por incorporação das células diferenciadas ou indiretamente pela liberação de fatores tróficos quando transplantadas no local da lesão [5]. Além de sua propriedade hipoinmunogênica, a viabilidade das CTM é importante para permitir sua migração e implantação após transplantes. Neste sentido, alguns estudos vêm pesquisando formas de aprimorar a sobrevivência celular [6].

A avaliação da viabilidade ou morte celular pode ser realizada utilizando-se o ensaio de citometria de fluxo com anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o iodeto de propídio (IP). Este método permite a discriminação entre células apoptóticas e necróticas [7]. A proteína da anexina V pertence a uma família de proteínas de ligação de fosfolípidios que se liga especificamente, na presença do cálcio, a fosfolípidios carregados negativamente, como a fosfatidilserina (FS). Na maioria dos casos, a translocação da FS à superfície celular ocorre antes da condensação do DNA, permeabilização da membrana plasmática e formação dos prolongamentos da membrana servindo, portanto, como uma medida rápida e conveniente da apoptose precoce [8]. A translocação da FS não é única da apoptose, mas também ocorre durante a necrose celular. A diferença entre essas duas formas de morte é que, durante as fases iniciais da apoptose, a membrana celular permanece intacta, enquanto que no mesmo momento que a necrose ocorre, a membrana celular perde sua integridade e se torna permeável. Portanto, a mensuração da ligação da anexina V à superfície celular como indicador de apoptose deve ser realizada em conjunto com um teste de exclusão de corante para estabelecer a integridade da membrana celular, como por exemplo, o IP [9], o qual detecta a perda da integridade da membrana celular [10].

As características inerentes às CTM tornam-as muito atrativas para seu uso na terapia celular e na medicina regenerativa. No entanto, sua segurança *in vivo*, incluindo a toxicidade e tumorigenicidade também devem ser estudadas [11]. A análise do cariótipo é utilizada para identificar marcadores cromossômicos, o gênero e a espécie animal e para analisar o número característico de cromossomos de determinada espécie e determinar aneuploidia em linhagens celulares. É um método sensível, fornece informações importantes na confirmação da identidade celular [12] e é uma técnica suficiente para identificar alguma alteração estrutural ou numérica dos cromossomos se uma grande área do DNA é afetada [11].

O cão (*Canis lupus familiaris*) possui o maior número de cromossomos diploides dos animais domésticos, com um cariótipo de 38 autossomos e dois cromossomos sexuais ($2n=78$), sendo todos os autossomos acrocêntricos. Até recentemente, esse cariótipo era pouco compreendido, pelo grande número de cromossomos, de seu tamanho e da ausência de um padrão claro de bandas R. No entanto, algumas técnicas como a hibridização *in situ* fluorescente auxiliaram na compreensão e descrição do cariótipo canino e de outros canídeos [13,14].

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é estudar a viabilidade e a estabilidade do cariótipo das CTM-TA e CTM-MO caninas durante seu cultivo *in vitro*, comparando-as quanto à porcentagem de células viáveis, em apoptose precoce, em apoptose tardia e necróticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ética no uso de animais

Todas as etapas do estudo foram conduzidas de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu (protocolo n.94/2013).

Grupo Experimental

No total, foram utilizadas 10 amostras de cães adultos de aproximadamente cinco anos, de ambos os gêneros, sendo cinco amostras de tecido adiposo, providas de cães adultos submetidos a cirurgias eletivas ortopédicas, e cinco amostras de medula óssea coletadas da tuberosidade maior do úmero de cães hígidos adultos.

A fim de comprovar sua higidez, os animais foram submetidos à colheita de amostra para os seguintes exames laboratoriais:

- sangue total em EDTA para realização de hemograma com contagem de plaquetas;
- soro sanguíneo para determinação da atividade da alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamiltransferase, proteína total, albumina, globulinas, creatinina e uréia.

Colheita das Amostras e Isolamento das CTM

CTM Derivadas do Tecido Adiposo

Aproximadamente 4 ml de tecido adiposo foi coletado e armazenado em tubo cônico de 50 ml, estéril, contendo Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), ficando completamente submerso.

Para isolar as CTM-TA, o tecido adiposo foi dissecado em pequenos fragmentos (1-2 mm³), lavado com HBSS e digerido com colagenase tipo 1 a 0,04% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). O tubo com o tecido fragmentado foi mantido em banho-maria a 37°C e agitado a cada 10 minutos. Posteriormente, foi realizada neutralização da enzima com o meio de cultivo contendo 90% de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alta glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) (Novafarma, Anápolis, Brasil) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O material foi filtrado com filtro de 70 µm, centrifugado a 340G por 10 minutos, o sobrenadante foi aspirado e acrescido do meio de cultivo e homogeneizado para centrifugação subsequente. Novamente removeu-se o sobrenadante e adicionou-se o meio de cultivo previamente descrito. As células foram contadas em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão do azul de tripano (Invitrogen, São Paulo, Brasil), totalizando uma média de 3,325 x 10⁶ células, divididas em duas garrafas de 25 cm² contendo 4 mL de meio e cultivadas sob as condições descritas posteriormente.

CTM Derivadas da Medula Óssea

Os cães foram submetidos à medicação pré-anestésica com morfina (Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 0,5 mg/kg por via intramuscular, indução com propofol (Cristália, São Paulo, Brasil) em dose máxima de 5 mg/kg intravenosa e manutenção com isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil) diluído em oxigênio a 100%. O animal foi monitorado por monitor multiparamétrico (eletrocardiograma, oximetria de pulso, capnografia e pressão não-invasiva).

Após a tricotomia e antissepsia da porção cranial proximal do membro torácico, na região correspondente à tuberosidade maior do úmero, foi introduzida a agulha de punção de medula óssea heparinizada e, uma vez bem fixa a agulha no úmero, o mandril foi retirado e procedeu-se a aspiração das células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20 mL contendo 1 mL de heparina a 1000 UI/mL (Cristália, São Paulo, Brasil).

Em seguida, as amostras da medula óssea foram encaminhadas ao fluxo laminar e foram filtradas com o auxílio de um equipo de transfusão a fim de remover os coágulos que poderiam estar presentes. Então, o material foi centrifugado a 340G por 10 minutos, sendo o sobrenadante (plasma e gordura) descartado e o material remanescente reservado. Ao material remanescente, foi adicionado DMEM alta glicose (Invitrogen, São Paulo, Brasil) na proporção 1:1. Posteriormente, essa mistura foi adicionada lentamente a 4 mL de uma solução de polisucrose e diatrizoato de sódio com densidade de 1.077 ± 0.001

g/mL (Histopaque®-1077) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e, em seguida, procedida uma nova centrifugação a 340G por 40 minutos para a obtenção da camada de células mononucleares, onde estão presentes as CTM. A camada de células mononucleares resultante da centrifugação foi aspirada cautelosamente e acondicionada em um novo tubo, no qual foi acrescido o meio DMEM alta glicose na proporção 1:1. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 340G por 10 minutos para a remoção do Histopaque®-1077 remanescente. O *pellet* de células resultantes foi ressuspensão com o meio DMEM alta glicose (1 mL) e submetido a uma nova centrifugação a 340G por 10 minutos. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao novo *pellet* formado foi acrescido 2 mL do meio contendo 90% de DMEM alta glicose, 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL). As células foram contadas em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão do azul de tripano, totalizando uma média de $22,20 \times 10^6$ células, divididas em duas garrafas de 25 cm² contendo 4 mL de meio e cultivadas sob as condições descritas posteriormente.

Cultivo das CTM

As garrafas foram identificadas e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Após as primeiras 48 horas sem manipulação, para que houvesse a adesão celular, o meio dos cultivos foi trocado e as células não aderidas foram descartadas. Após esse período, as garrafas foram monitoradas periodicamente e o meio de cultura foi trocado a cada 3 a 4 dias. A passagem das CTM foi realizada quando se atingiu uma confluência de aproximadamente 80 a 90%. Para isso, foi realizada a tripsinização. Para tal procedimento, o meio de cultivo das garrafas foi descartado, estas foram lavadas com HBSS aquecido a 37°C e acrescidas de 2 mL de uma solução de tripsina a 0,25% (Invitrogen, São Paulo, Brasil) a 37°C. As garrafas foram levadas à estufa por 7 minutos para que as células se destacassem da garrafa. Com as células em suspensão, foi adicionado 1 mL de meio de cultivo com 90% de DMEM alta glicose, 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL) para bloqueio da ação da tripsina. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 340G por 10 minutos para a remoção da tripsina. O novo *pellet* formado foi ressuspensão em meio de cultivo, centrifugado novamente e ressuspensão em meio. O conteúdo de uma garrafa do cultivo primário foi dividido para expansão e posterior realização dos testes de diferenciação, cariotipagem, viabilidade e imunofenotipagem por citometria de fluxo. O tempo de cultivo primário e de primeira passagem foram registrados em número de dias.

Diferenciações Adipogênica, Condrogênica e Osteogênica

Para confirmação da linhagem mesenquimal, as células cultivadas foram induzidas a se diferenciarem *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Para tanto, na segunda passagem, as amostras foram tripsinizadas e acondicionadas em placas de 24 poços para diferenciação osteogênica e adipogênica. Para isso, foram utilizados os conjuntos de diferenciação Stempro Adipogenesis® e Stempro Osteogenesis® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) seguindo-se as recomendações do fabricante. Os meios de cultivo foram trocados a cada 3 dias. A demonstração da diferenciação adipogênica e osteogênica foi realizada fixando-se o material com paraformaldeído a 4% (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) e utilizando as colorações histológicas de Oil Red e Alizarin Red (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) após 14 e 21 dias, respectivamente. Para a diferenciação condrogênica, um *pellet* de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ e $1,465 \times 10^6$ de CTM-TA e CTM-MO, respectivamente, foi cultivado em um tubo Falcon de 15 mL em 3D, sendo o meio de diferenciação Stempro Chondrogenesis® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) trocado a cada 3 dias, durante 21 dias. A demonstração da diferenciação foi realizada após a fixação com paraformaldeído a 4% e então pelo depósito de matriz cartilaginosa pelas colorações histológicas de alcian blue (pH 2,5) (Merck, Darmstadt, Alemanha), azul de toluidina e hematoxilina-eosina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a partir de lâminas provenientes do *pellet* emblocado em parafina. Para cada diferenciação, foram realizados controles negativos de ambos os tipos teciduais, os quais foram mantidos em meio com 90% DMEM alta glicose, 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL).

Imunofenotipagem

As amostras de CTM-TA e de CTM-MO foram submetidas à análise em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) para avaliação da expressão dos marcadores de superfície CD34 (mouse anti-human CD34-FITC, Becton Dickinson Company, San Jose, EUA), CD45

(rat anti-dog CD45, Abd Serotec, Raileigh, EUA), CD44 (rat anti-mouse CD44, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), CD90 (mouse anti-human CD90-FITC, Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) e CD105 (mouse anti-human CD105, Abcam, Cambridge, EUA). Para os marcadores primários não conjugados foram utilizados os anticorpos secundários goat anti-rat IgG-FITC (Millipore, Temecula, EUA) e goat anti-mouse IgG-FITC (Abd Serotec, Raileigh, EUA). Todos os anticorpos utilizados possuíam marcação com o fluoróforo FITC. Controles positivos para os marcadores CD34 e CD45 foram executados previamente ao experimento. Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelos fabricantes de cada um dos anticorpos primários e secundários. As amostras em segunda passagem foram tripsinizadas, lavadas em HBSS e contadas em câmara de Neubauer. Após, foram filtradas em filtro de 70 μm e distribuídas em tubos de poliestireno de fundo redondo contendo aproximadamente 2×10^5 células e incubadas com o anticorpo primário durante uma hora. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos secundários por mais uma hora e então lavadas duas vezes com HBSS. Para as amostras e seus respectivos controles, 20000 eventos foram coletados para análise. Após a análise, os dados foram arquivados para posterior avaliação pelo software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA).

Análise da Apoptose Celular com Anexina V e Iodeto de Propídio

A tripsinização das CTM-TA e CTM-MO foi realizada em segunda passagem, sendo marcadas com anexina V e iodeto de propídio (IP), incubadas e analisadas por citometria de fluxo utilizando um citômetro LSR Fortessa (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA). Para esta avaliação, foram utilizadas as sondas anexina V-FITC Kit de apoptose (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) e IP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) de acordo com as recomendações do laboratório. Assim, as amostras foram diluídas em solução tampão de anexina V (10 mM Hepes/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Um volume de 200 μL (concentração final de 2×10^5 células) desta amostra foi colocado em um tubo de cultura de 5 mL e então acrescido de 5 μL de anexina V-FITC e 5 μL de IP (50 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). A amostra foi homogeneizada e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 μL de solução tampão de anexina V para uma concentração final de 5×10^5 células/mL. Um total de 10.000 eventos foi coletado para cada amostra e para o controle negativo. Após, os dados foram arquivados para posterior avaliação pelo software FACSDiva V6,2 (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA). As amostras foram analisadas de acordo com Cho *et al.* [15] e classificadas em células viáveis (anexina V e IP negativos), em apoptose precoce (anexina V positiva e IP negativo), em apoptose tardia (anexina V e IP positivos) e necróticas (anexina V negativa e IP positivo).

Análise do Cariótipo

Amostras de ambos os grupos foram submetidas à análise do cariótipo em terceira ou quarta passagens utilizando-se o método de sincronização do ciclo celular com metotrexato/timidina. Para verificar qualquer alteração cromossômica após o tratamento das células, foi procedida a análise do cariótipo de amostras dos grupos de ambas as origens teciduais, realizada no dia 08 (para CTM-TA) e no dia 11 (para CTM-MO) pós-irradiação. As garrafas com as células em cultivo foram observadas em microscópio invertido (Axiovert Zeiss 40C, Zeiss, Thornwood, EUA) a fim de acompanhar seu crescimento. Às culturas foram acrescidos 50 μL de metotrexato (farmácia de manipulação), cobertas com papel alumínio e mantidas durante 16 horas em estufa a 37°C. Após, foram acrescentados 50 μL de 5-monofosfato de timidina (United States Biochemical Corporation, Cleveland, EUA) e mantidas durante 3,5 horas a 37°C. Em seguida, 100 μL de colchicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) foram acrescentados à cultura e, após 4 horas, as amostras foram ressuspensas com 2 mL de tripsina (Invitrogen, São Paulo, Brasil), centrifugadas a 340 G durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 5 mL de cloreto de potássio às amostras e mantidas durante 20 minutos a 37°C. A hipotonização com o cloreto de potássio foi interrompida com 1 mL de metanol (3:1 em ácido acético glacial 100%) (Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas novamente a 340 G durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram colocados 5 mL da mesma solução de metanol. Procedeu-se nova centrifugação (340 G por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado parcialmente, mantendo 1 mL no tubo. Em seguida, as amostras foram gotejadas em lâminas, secas e coradas com coloração de Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha). As lâminas foram então observadas em microscópio óptico e foram analisadas em média 12 metáfases para cada amostra.

Análise dos Resultados

Os resultados de ambos os grupos foram analisados por estatística descritiva para as variáveis de dias de cultivo primário e primeira passagem, para as diferenciações adipogênica, condrogênica e osteogênica, para a imunofenotipagem e para o cariótipo.

Para a análise da viabilidade, inicialmente a distribuição das variáveis-resposta foi analisada. Devido à presença de graus variados de assimetria e desvios de um padrão Gaussiano de distribuição, o teste de Kruskal-Wallis [16] foi utilizado para comparar cada variável-resposta entre os tecidos. A análise estatística foi realizada com o procedimento PROC NPAR1WAY [17] e a significância estatística foi definida como $p < 0.05$.

RESULTADOS

Diferenciações Adipogênica, Condrogênica e Osteogênica

As diferenciações nas linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica foram registradas e encontram-se ilustradas nas Fig. 1 e 2. Na diferenciação adipogênica, as CTM-TA e CTM-MO apresentaram depósitos lipídicos intracitoplasmáticos corados com oil red após 14 dias de cultivo. Na diferenciação osteogênica dos grupos, a coloração de alizarin red demonstrou extensos depósitos de cálcio nos cultivos após 21 dias. Já na diferenciação condrogênica, as colorações de alcian blue e azul de toluidina revelaram depósitos de matriz cartilaginosa após 21 dias de cultivo das CTM de ambos os tecidos. Visivelmente, as CTM-TA tiveram uma diferenciação condrogênica muito mais intensa do que as CTM-MO.

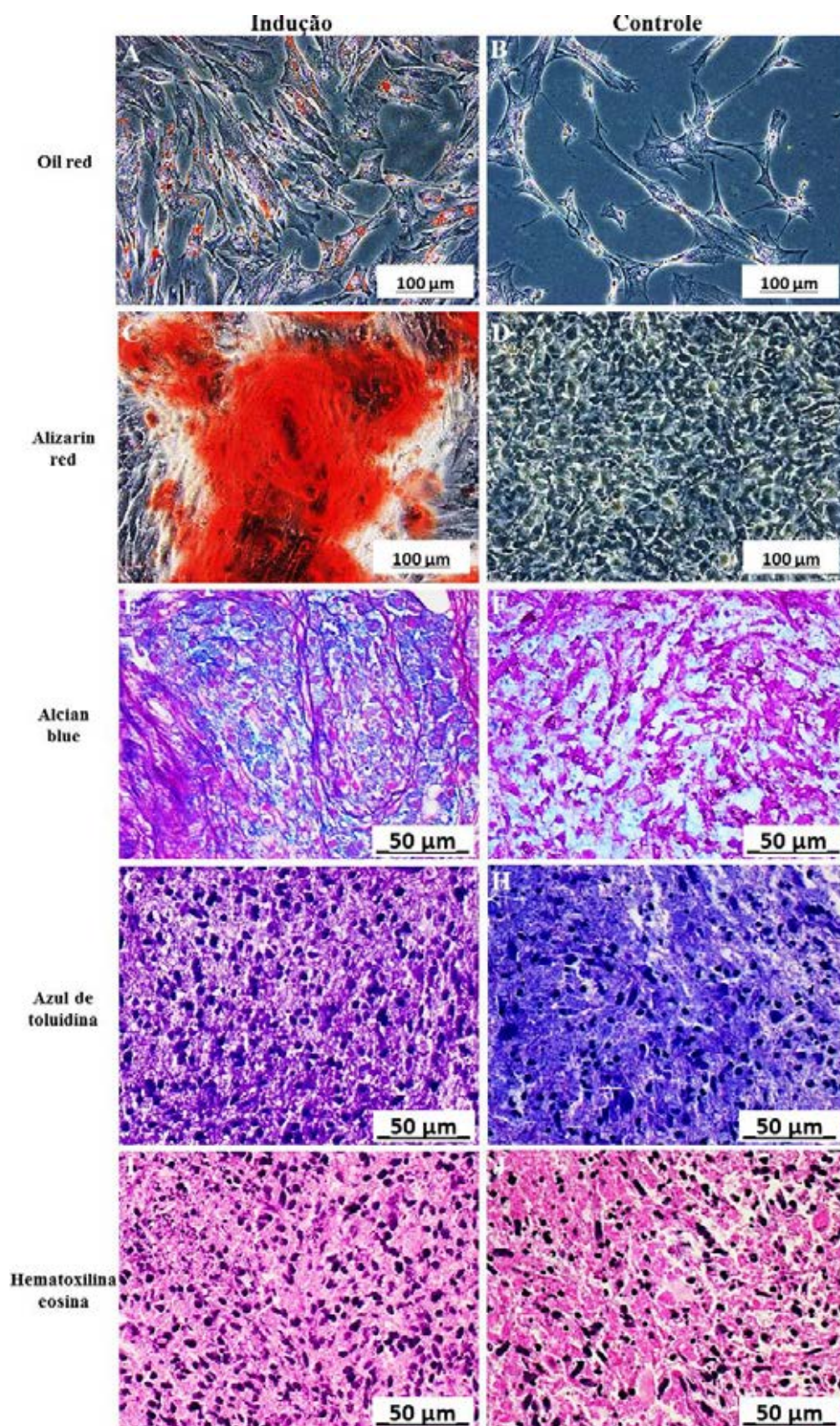


Fig. (1). Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM-TA e seus respectivos controles. (A) CTM-TA mantidas em meio de diferenciação adipogênica; (C) CTM-TA mantidas em meio de diferenciação osteogênica; (E, G, I) CTM-TA mantidas em meio de diferenciação condrogênica; (B, D, F, H, J) CTM-TA mantidas em meio DMEM, SFB, antibiótico e antimicótico; (A, B) Coloração de oil red; (C, D) coloração de alizarin red; (E, F) coloração de alcian blue; (G, H) coloração de azul de toluidina; (I, J) coloração de hematoxilina-eosina.

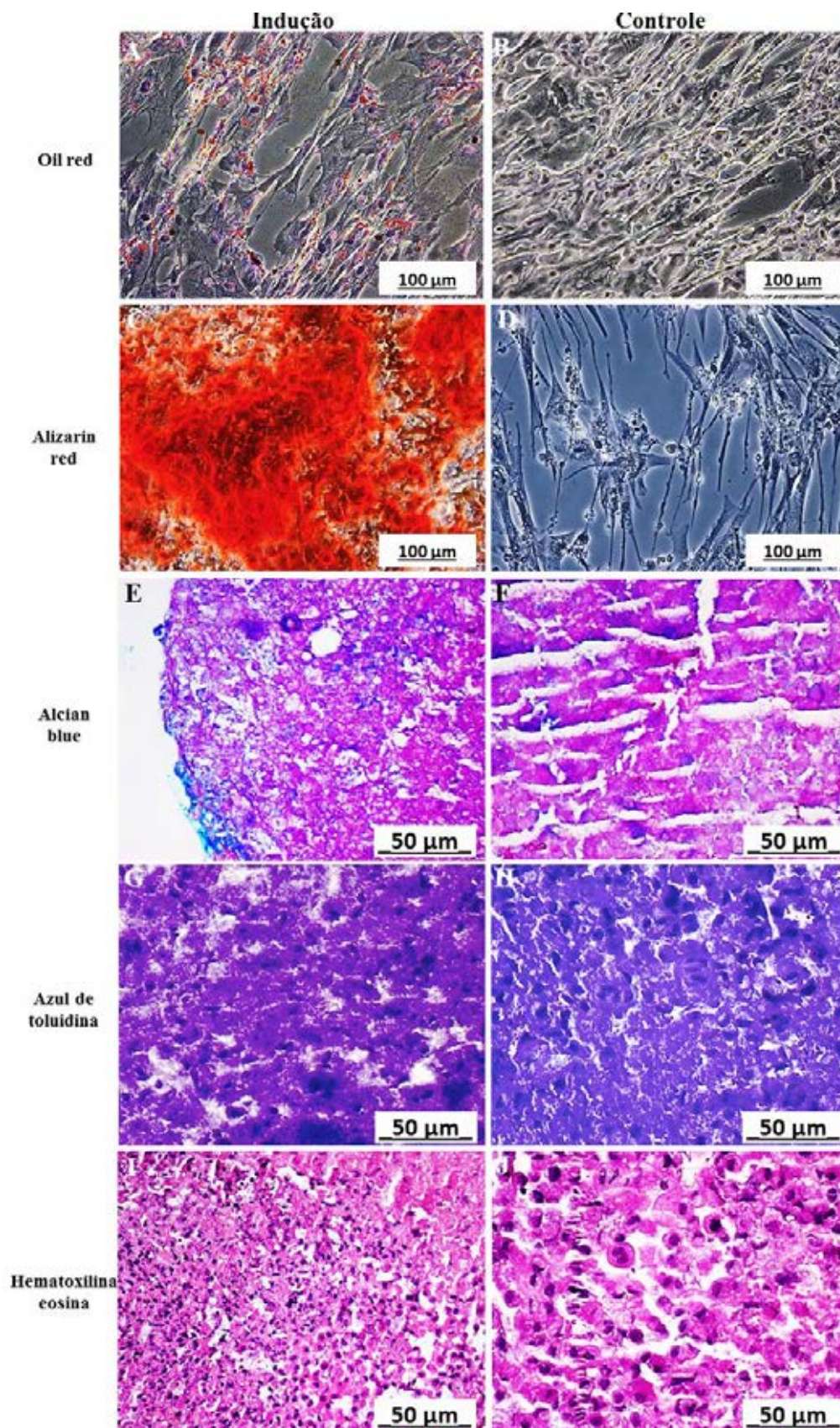


Fig. (2). Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM-MO e seus respectivos controles. (A) CTM-MO mantidas em meio de diferenciação adipogênica; (C) CTM-MO mantidas em meio de diferenciação osteogênica; (E, G, I) CTM-MO mantidas em meio de diferenciação condrogênica; (B, D, F, H, J) CTM-MO mantidas em meio DMEM, SFB, antibiótico e antimicótico; (A, B) Coloração de oil red; (C, D) coloração de alizarin red; (E, F) coloração de alcian blue; (G, H) coloração de azul de toluidina; (I, J) coloração de hematoxilina-eosina.

Imunofenotipagem

As análises da citometria de fluxo encontram-se ilustradas na Fig. 3 e as medianas da porcentagem de expressão dos marcadores de superfície CD34, CD45, CD44, CD90 e CD105, bem como seus valores mínimos e máximos, encontram-se descritas na Tabela 1.

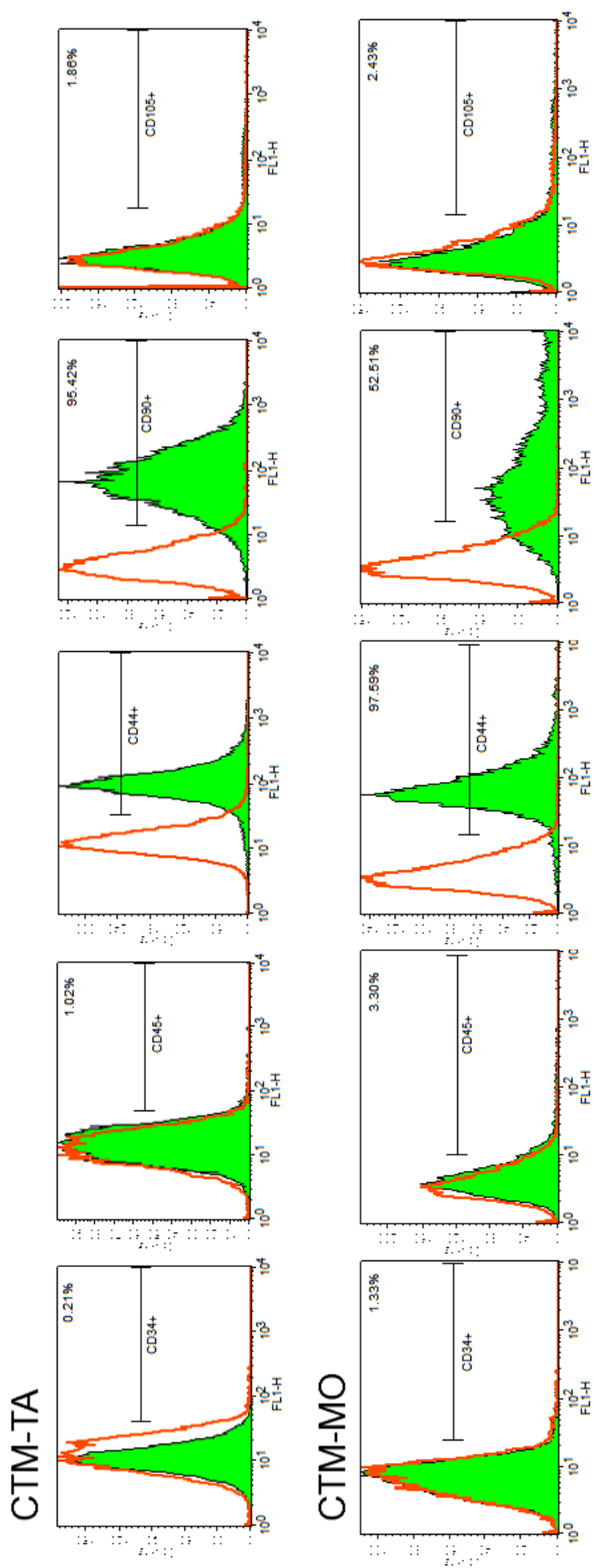


Fig. (3). Expressão dos marcadores de superfície CD34, CD45, CD44, CD90 e CD105 nas CTM-TA (acima) e CTM-MO (abaixo) pela técnica de citometria de fluxo. A linha laranja indica o controle negativo do respectivo marcador e a área verde representa a amostra testada.

Tabela 1. Imunofenotipagem das CTM-TA e CTM-MO analisada pela técnica de citometria de fluxo.

Marcador	Variável	CTM-TA	CTM-MO
CD34	Mediana	0,21	1,33
	Mínimo	0,08	0,53
	Máximo	0,80	2,15
CD45	Mediana	1,02	3,30
	Mínimo	0,72	0,10
	Máximo	2,14	7,59
CD44	Mediana	99,66	97,59
	Mínimo	96,25	67,98
	Máximo	99,86	99,76
CD90	Mediana	95,42^a	52,51^b
	Mínimo	83,81	8,49
	Máximo	98,10	79,32
CD105	Mediana	1,86	2,43
	Mínimo	1,06	2,22
	Máximo	2,27	7,08

Os resultados estão representados como medianas, mínimo e máximo da porcentagem de expressão dos marcadores de superfície analisados. ^{a,b} P<0,05.

Análise da Apoptose Celular com Anexina V e Iodeto de Propídio

A viabilidade das CTM-TA e CTM-MO apresentam-se ilustradas na Fig. 4 e foi semelhante entre os grupos, como demonstrado nos dados da Tabela 2.

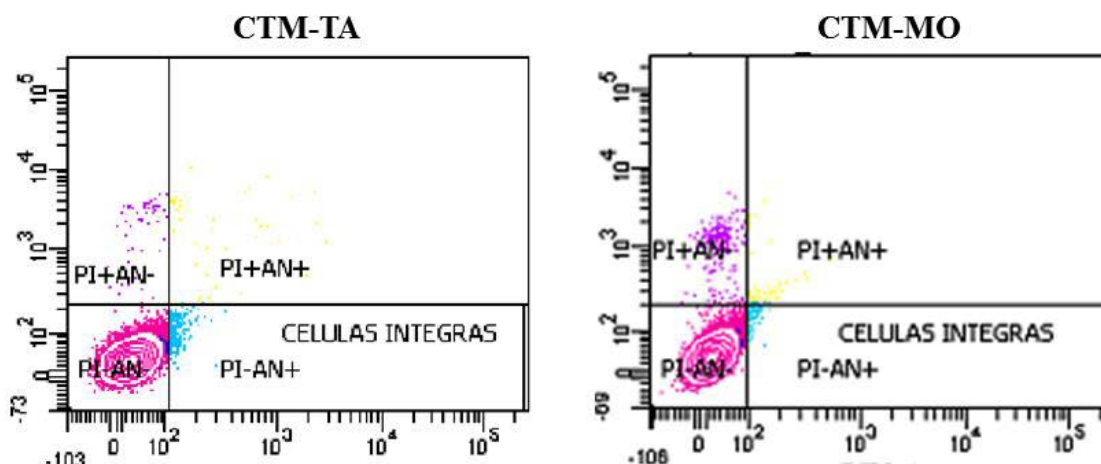


Fig. (4). Expressão de anexina V e iodeto de propídio das CTM-TA e CTM-MO. Dot plot resultante da citometria de fluxo, demonstrando as populações de células viáveis (quadrante inferior esquerdo), em apoptose precoce (quadrante inferior direito), em apoptose tardia (quadrante superior esquerdo) e necróticas (quadrante superior direito).

Tabela 2. Análise da apoptose das CTM-TA e CTM-MO. Mediana (%) da viabilidade das CTM-TA e CTM-MO realizada por citometria de fluxo com as sondas anexina V (An+ representa marcação positiva e An- marcação negativa para anexina V) e iodeto de propídio (IP+ representa marcação positiva e IP- marcação negativa para iodeto de propídio)

Categoria	Variável	CTM-TA	CTM-MO
Viáveis (an V – e IP -)	Mediana	96,50	96,50
	Mínimo	90,80	76,50
	Máximo	98,20	97,70
Apoptose precoce (an V + e IP -)	Mediana	2,60	0,90
	Mínimo	0,80	0,60
	Máximo	5,70	4,20
Apoptose tardia (an V + e IP +)	Mediana	0,50	1,10
	Mínimo	0,20	0,50
	Máximo	2,90	13,20
Necrose (an V – e IP +)	Mediana	0,50	2,20
	Mínimo	0,40	0,70
	Máximo	0,70	6,20

Análise do Cariótipo

As amostras de CTM-TA e CTM-MO analisadas apresentaram cariótipo diploide normal para a espécie ($2n=78$, XX ou XY) e não foram encontradas alterações estruturais cromossômicas (Fig. 5).

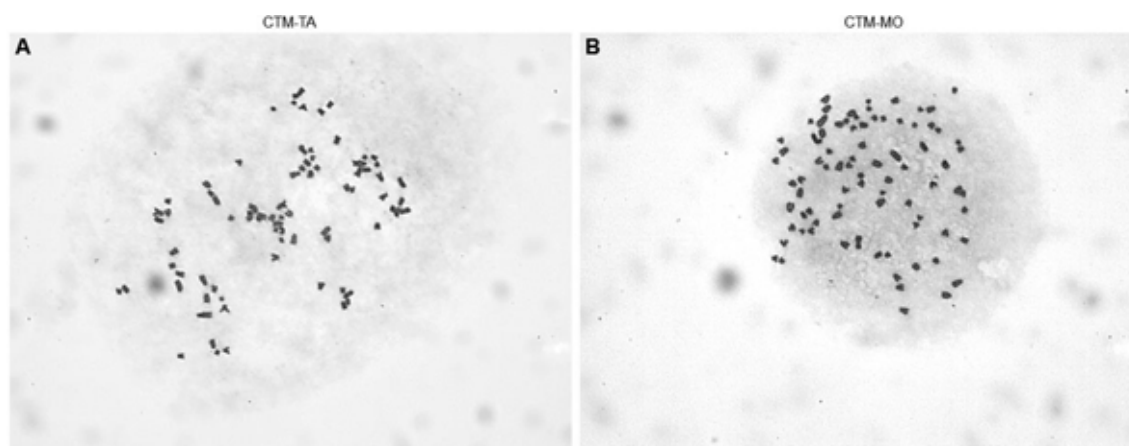


Fig. (5). Cariótipo normal das CTM-TA (A) e CTM-MO (B).

DISCUSSÃO

Devido às CTM não possuírem um marcador específico para sua identificação, os critérios utilizados para sua caracterização são a aderência ao plástico após isolamento, a expressão de marcadores de superfície de linhagem mesenquimal e seu potencial de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* [18]. Desta forma, o presente trabalho avalia a viabilidade e o cariótipo das CTM-TA e CTM-MO caninas, que são importantes para terapias onde estas células serão transplantadas. Além disso, descreve as características multipotenciais pelas diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica e de imunofenotipagem pelos marcadores de superfície.

As amostras de tecido adiposo e da medula óssea foram facilmente coletadas e os protocolos para isolamento e expansão das CTM-TA e CTM-MO foram eficientes e reprodutíveis, sendo necessários, em média, 16 e 10 dias, respectivamente, para expansão das células no cultivo primário e 7 e 4 dias em primeira passagem. Estes números foram semelhantes aos relatados na literatura, a qual cita que os cultivos primários de CTM suínas e humanas geralmente são mantidos por 10 a 16 dias até que atinjam confluência [2,3]. Elas apresentaram morfologia fibroblastoide e aderência ao plástico quando em cultivo, assim como em outros estudos [2,19,20,21,22,23,24,25,26,27]. De Ugarte *et al.* [28] sugerem que há poucas diferenças entre as CTM-TA e CTM-MO em termos de cinética de crescimento, senescência das células, capacidade de diferenciação multilinhagens e eficiência de transdução de genes. No estudo de

Bosch *et al.* [19], a morfologia, o perfil de antígenos de superfície e as características pluripotenciais forneceram evidências convincentes para afirmar que os cultivos eram constituídos de CTM-MO suínas.

Para demonstração das características multipotenciais das CTM-TA e CTM-MO, estas foram induzidas *in vitro* a se diferenciar nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Tais diferenciações já foram demonstradas em CTM provenientes de diversos tecidos de cães, como veia umbilical [29], medula óssea [5,20,23,24,25,26,27,30,31,32,33,34,35,36,37], tecido adiposo [5,21,22,25,35,37,38,39,40,41,42,43,44], sangue periférico [45], sangue do cordão umbilical [30], derme [37], polpa dentária [46], fígado fetal e saco vitelino [36].

Os cultivos de CTM-MO são heterogêneos e contêm populações de células pré-osteoblásticas e pré-adipocíticas, além das CTM multipotentes, o que pode ser um fator determinante no resultado das diferenciações *in vitro* [47].

De acordo com Nbaheen *et al.* [47], populações de CTM humanas obtidas de variados tipos celulares apresentam diferenças significativas em sua proliferação, diferenciação e fenótipo molecular, as quais devem ser levadas em conta no planejamento de seu uso em protocolos clínicos. Da mesma forma, algumas diferenças foram detectadas no presente estudo, principalmente na diferenciação e expressão dos antígenos de superfície.

Na imunofenotipagem, tanto as CTM-TA quanto as CTM-MO apresentaram alta expressão de CD44 e expressão negativa de CD34, CD45 e CD105. No entanto, o CD90 teve alta expressão nas CTM-TA e expressão moderada nas CTM-MO. Estes resultados diferem de Ock *et al.* [37], no qual as CTM-MO e as CTM derivadas da derme canina não expressaram CD45, enquanto que as CTM-TA tiveram baixa expressão. Já para o CD90 e CD105, as CTM das três fontes tiveram igualmente expressão positiva. No entanto, o método de avaliação foi qualitativo, visto que foi realizada pela técnica de imunofluorescência. Esta técnica também foi utilizada em outro trabalho, onde as CTM-MO expressaram CD90 e CD105 e não expressaram CD34 e CD45 [20]. Outro estudo demonstrou, por citometria de fluxo, que as CTM-TA não expressaram CD34 e CD45 e apresentaram marcação positiva para CD44 e CD90, porém este último em porcentagem mais baixa que em nosso estudo (25%) [38] e no de Kim *et al.* [48]. Nossos resultados são semelhantes aos de Lee *et al.* [21], onde as CTM-TA apresentaram marcação positiva para CD44 (98,2%) e CD90 (89,6%) e negatividade para CD34. Em outros estudos, as CTM-TA tiveram expressão negativa para CD34 e CD45 e positiva para CD44, CD90 [41,44] e CD105 [49]. Em outro estudo com CTM-MO, a expressão do CD44 foi positiva enquanto que do CD90 e do CD45 foi negativa [36].

Cheng *et al.* [1] afirma que as CTM-TA humanas devem expressar CD44, CD90 e CD105 e não expressar os marcadores das linhagens hematopoiética e endotelial CD31, CD34 e CD45. Porém, em cultivos primários de CTM-TA caninas, Oh *et al.* [22] verificaram somente 6% de positividade para o marcador CD105 e sua expressão foi negativa nos estudos de Kim *et al.* [48], Kiefer *et al.* [41], Vieira *et al.* [50] e Lee *et al.* [21], assim como em nosso estudo. No estudo de Lee *et al.* [21], o CD105 foi negativo em passagens mais tardias, demonstrando que os marcadores de CTM (CD90 e CD105) diminuíram sua expressão ao aumentar o tempo de cultivo. Outros autores também verificaram diminuição da expressão de CD90 e CD105 ao longo das passagens, pela técnica de RT-PCR [51]. Em um estudo de CTM derivadas da polpa dentária de cães, houve expressão negativa para CD45 e CD105, como em nosso estudo, e baixa expressão positiva para CD90 (3,6%) [46].

A apoptose celular foi medida pela anexina V, uma proteína com afinidade por fosfolipídios na superfície da membrana plasmática, que sofre translocação no início da apoptose [8,52]. Após a perda da integridade da membrana, em uma fase mais avançada da apoptose, o IP pode adentrar a célula e se integrar ao DNA [53].

A análise da apoptose obtida em nosso estudo, por meio da marcação com anexina e IP, revelou que tanto as CTM-TA quanto as CTM-MO apresentaram alta viabilidade e não diferiram entre si. No estudo de Carvalho *et al.* [52], as CTM-MO murinas apresentaram viabilidade discretamente mais baixa (85,52%). Já as CTM-TA humanas apresentaram viabilidade de 94,03% [7], 98,8% [53] e aproximadamente 87% [54] em outros estudos.

Apesar de terem boa viabilidade *in vitro*, ainda existem muitas questões a serem esclarecidas a respeito das CTM-TA, como quais os fatores que influenciam em sua atividade, como os processos de proliferação e diferenciação podem ser controlados *in vitro* e *in vivo*, além da padronização de técnicas para monitorar e garantir a qualidade das CTM antes de sua aplicação [1]. Estas questões também se estendem às CTM de outras origens teciduais.

A estabilidade cromossômica é um fator crítico para determinar a segurança e qualidade das células-tronco [37]. A cariotipagem é suficiente para identificar alguma alteração estrutural ou numérica dos cromossomos se uma grande área do DNA é afetada [11] e é um indicador confiável para avaliar a estabilidade genética ou transformação *in vitro* das CTM cultivadas [55]. Assim, realizamos a análise do

cariótipo nas CTM de ambas as origens teciduais em nosso estudo, não encontrando nenhuma alteração estrutural ou numérica de cromossomos.

As CTM da matriz do cordão umbilical de cães também mostraram cariótipo normal após múltiplas passagens [21]. Em outro estudo, as CTM da matriz do cordão e da membrana amniótica caninas não apresentaram alterações cariotípicas, indicando que a idade gestacional não afeta a estabilidade dos cromossomos durante as primeiras passagens [56]. Ainda, nas células progenitoras mesenquimais de membrana amniótica, medula óssea e fígado fetal de cães também não ocorreram alterações nos cromossomos analisados em sexta passagem [36]. Em passagens precoces e tardias, as CTM-TA mantiveram um cariótipo diploide com 78 cromossomos [50].

Já no estudo de Ock *et al.* [37], as CTM-TA, CTM-MO e CTM da pele apresentaram ploidia acima de 90%, com as CTM-TA (91%) apresentando menor índice que as CTM-MO (99,3%) e CTM da pele (99,2%). Não houve a ocorrência de CTM haploides nesse estudo, mas sim altas taxas de tetraploides, principalmente das CTM-TA (CTM-TA 9%, CTM-MO 0,7% e CTM da pele 0,8%) [37].

Com tais resultados, percebe-se a complexidade dos cultivos de CTM, a necessidade de avaliar as técnicas de isolamento de tais células e de identificar novos marcadores celulares específicos. Além disso, é necessária maior informação a respeito da eficácia terapêutica e dos mecanismos de incorporação, migração e diferenciação *in vivo* das CTM [2].

Devido aos efeitos das CTM na reparação e regeneração teciduais demonstrados em animais, vários estudos clínicos baseados no transplante das CTM estão sendo realizados. No entanto, as consequências da alteração das propriedades de tais células *ex vivo* continuam causando preocupação [57]. Neste sentido, nosso trabalho traz importantes informações, como a alta viabilidade celular e a segurança de seu uso para transplante na espécie canina, porém uma limitação do atual trabalho é que foi realizado em passagens precoces, sendo necessários mais estudos para investigar se tais aspectos apresentam modificações em passagens mais tardias, visando futura implementação de bancos de CTM.

CONCLUSÃO

As CTM-TA e CTM-MO de cães apresentaram as características *in vitro* de células-tronco mesenquimais, ou seja, apresentaram morfologia fibroblastoide com aderência ao plástico, expressaram marcadores de superfície de células mesenquimais e diferenciaram-se nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.

Quanto à viabilidade, ambas as origens de CTM apresentaram alta viabilidade e não tiveram diferenças entre as fontes.

Além disso, as células de ambas as origens teciduais apresentaram cariotipagem normal, sem alterações numéricas ou estruturais de cromossomos.

Portanto, as CTM-TA e CTM-MO de cães constituem fontes adequadas e seguras para obtenção das células para um futuro transplante.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores deste artigo declaram que não existe conflito de interesse. O trabalho teve apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao prof. José Pantoja pelo auxílio com as análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

- [1] Cheng K, Kuo T, Kuo K, Hsiao C. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic Med Biomark Health Sci.* 2011; 3(2): 53-62.
- [2] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(4):568-84.

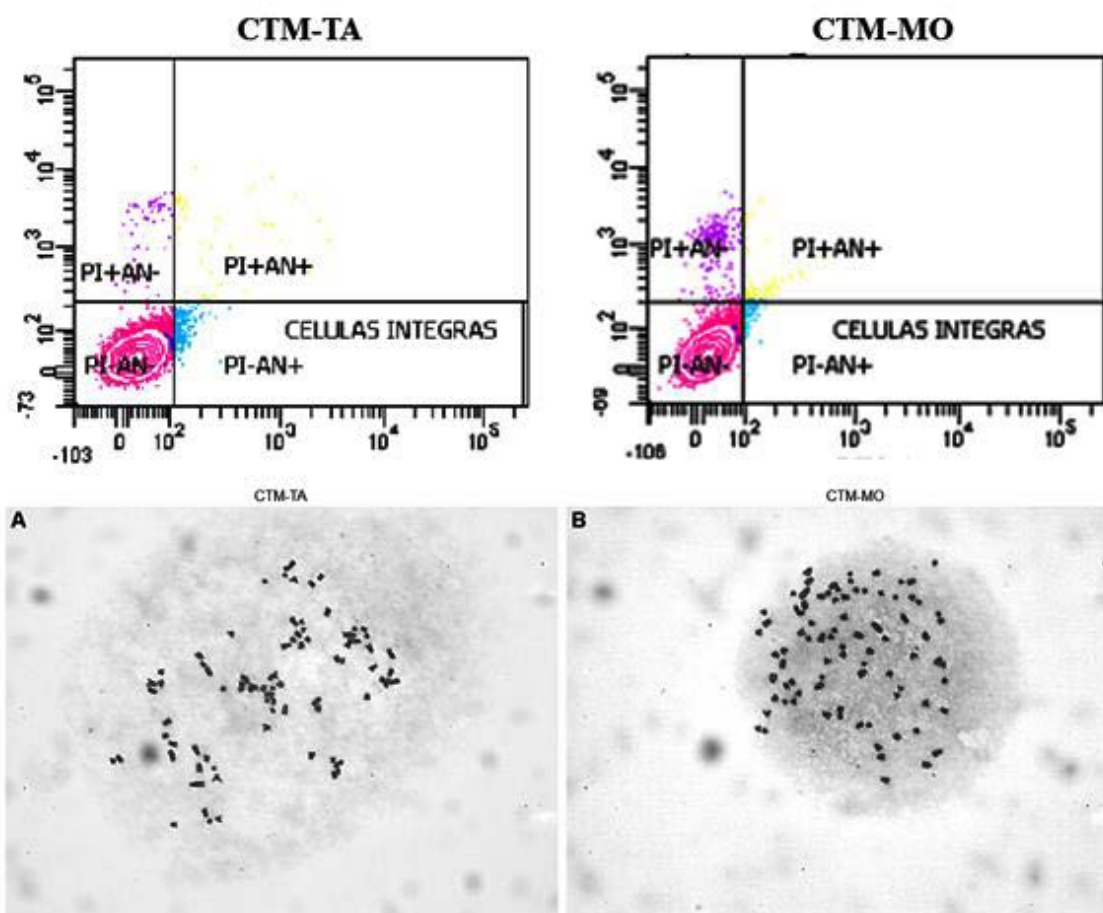
- [3] Casado JG, Gomez-Maurício G, Alvarez V, *et al.* Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. *Vet Immunol Immunopatol* 2012; 147: 104-12.
- [4] Astor DE, Hoelzler MG, Harman R, Bastian RP. Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. *Can J Vet Res* 2013; 77: 177-82.
- [5] Chung D, Hayashi K, Toupadakis, CA, Wong A, Yellowley CE. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Res Vet Sci* 2012; 92: 66-75.
- [6] Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 *in vitro* but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Revasc Med* 2006; 7: 19-24.
- [7] Buravkova LB, Rylova YV, Andreeva ER, *et al.* Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4418-25.
- [8] Bossy-Wetzel E, Green DR. Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Meth Enzymol* 2000; 322: 15-8.
- [9] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51.
- [10] Span LFR, Pennings AHM, Vierwinden G, Boezeman JBM, Raymakers RAP, Witte T. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using annexin-V/propidium iodide and a modified *in situ* end labeling technique. *Cytometry* 2002; 47: 24-31.
- [11] Ra JC, Shin IS, Kim SH, *et al.* Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev* 2011; 20(8): 1297-308.
- [12] Machado JZ, Miranda ACS, Gonçalves CR, Ikeda TI, Cruz AS. Isoenzyme electrophoresis and karyotype techniques as an alternative for cell line identity confirmation. *Virus Rev Res* 2014; 19(1): 1-5.
- [13] Galibert F, André C. The dog: a powerful model for studying genotype-phenotype relationships. *Comp Biochem Physiol* 2008; 3(1): 67-77.
- [14] Sargan DR, Yang F, Squire M, Milne BS, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA. Use of flow-sorted canine chromosomes in the assignment of canine linkage, radiation hybrid, and syntenic groups to chromosomes: refinement and verification of the comparative chromosome map for dog and human. *Genomics* 2000; 69: 182-195.
- [15] Cho H, Lee SH, Yoo JJ, Shon Y. Evaluation of cell viability and apoptosis in human amniotic fluid-derived stem cells with cryoprotectants. *Cryobiol* 2014; 68(2): 244-50.
- [16] Pagano M, Gauvreau K. Principles of Biostatistics. Belmont: Duxbury Press; 2000.
- [17] SAS Institute. SAS/STAT User's Guide: version 9.3. SAS Institute Inc.; 2011.
- [18] Dominici M, LeBlanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- [19] Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 2006; 74: 46-57.
- [20] Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol* 2007; 128: 507-20.
- [21] Lee KS, Kang HW, Lee HT, *et al.* Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci* 2014; 96: 267-75.
- [22] Oh HJ, Park JE, Kim MJ, *et al.* Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. *Theriogenology* 2011; 75: 1221-31.
- [23] Rezaei M, Jamshidi S, Saffarpour A, *et al.* Isolation, characterization and transduction of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (cBM-MSCs). *Iran J Vet Med* 2013; 7(3): 193-9.
- [24] Singh S, Deka D, Mulinti R, Sood NK, Agrawal RK, Verma R. Isolation, culture, in-vitro differentiation and characterization of canine adult mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci* 2014; 1-10.
- [25] Spencer ND, Chun R, Vidal MA, Gimble JM, Lopez MJ. In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Vet J* 2012; 191: 231-9.
- [26] Tharasanit T, Phutikanit N, Wangdee C, *et al.* Differentiation potentials of canine bone marrow mesenchymal stem cells. *Thai J Vet Med* 2011; 41(1): 79-86.

- [27] Volk SW, Wang Y, Hankenson KD. Effects of donor characteristics and ex vivo expansion on canine mesenchymal stem cells properties: implications for MSC-based therapies. *Cell Transplant* 2012; 21(10): 2189-200.
- [28] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, *et al.* Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2013; 174: 101-9.
- [29] Zucconi E, Vieira NM, Bueno, DF, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells Dev* 2010; 19(3): 395-402.
- [30] Groza I, Cătană L, Pall E, Cenariu M, Pop D, Ilea C. Evaluation of the multilinear capacity of canine mesenchymal stem cells. *Scientific Work. C Series. Vet Med* 2012; 58(4):198-203.
- [31] Kamishina H, Farese JP, Storm JA, Cheeseman JA, Clemmons RM. The frequency, growth kinetics and osteogenic/adipogenic differentiation properties of canine bone marrow stromal cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2008; 44(10): 472-9.
- [32] Lima SAF, Wodewotzky TI, Lima-Neto JF, Beltrão-Braga PCB, Alvarenga FCL. Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. *Pesq Vet Bras* 2012; 32(5): 463-9.
- [33] Liao H, Chen C, Chen J. Osteogenic differentiation and ectopic bone formation of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in injectable thermo-responsive polymer hydrogel. *Tissue Eng Part C* 2011; 17(11): 1139-49.
- [34] Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003; 123: 702-11.
- [35] Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res* 2012; 8: 150.
- [36] Wenceslau CV, Miglino MA, Martins DS, *et al.* Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. *Tissue Eng* 2011; 17(17-18): 2165-76.
- [37] Ock S, Maeng G, Lee Y, *et al.* Donor-matched functional and molecular characterization of canine mesenchymal stem cells derived from different origins. *Cell Transplant* 2013; 22: 2311-21.
- [38] Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, *et al.* Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci* 2011; 91: 18-24.
- [39] Schwartz C, Leicht U, Drosse I, *et al.* Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Vet Res Commun* 2011; 35: 487-99.
- [40] Schwartz C, Leicht U, Rothe C, *et al.* Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Res Vet Sci* 2012; 93: 457-62.
- [41] Kiefer KM, Phuhar GE, Conzemius MG, O'Brien TD. The influence of culture medium type on cellular phenotype of canine adipose derived stem cells. *Open J Regen Med* 2014; 3:28-37.
- [42] Neupane M, Chang C, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2008; 14(6): 1007-15.
- [43] Patricio LFL, Rebelatto CLK, Brofman PRS, *et al.* Isolamento e caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013; 65(4): 946-54.
- [44] Zhang N, Dietrich MA, Lopez MJ. Canine intra-articular multipotent stromal cells (MSC) from adipose tissue have the highest in vitro expansion rates, multipotentiality, and MSC immunophenotypes. *Vet Surg* 2013; 42: 137-46.
- [45] Huss R, Lange C, Weissinger EM, Kolb H, Thalmeier K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic adherent CD34^{-low} hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* 2000; 18: 252-60.
- [46] Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J Endod* 2011; 37(8): 1074-80.
- [47] Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, *et al.* Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev Rep* 2013; 9: 32-43.
- [48] Kim GA, Oh HJ, Lee, TH, *et al.* Effect of culture medium type on canine adipose-derived mesenchymal stem cells and developmental competence of interspecies cloned embryos. *Theriogenology* 2014; 81:243-9.
- [49] Oh HJ, Park EJ, Lee SY, *et al.* Comparison of cell proliferation and epigenetic modification of gene expression patterns in canine foetal fibroblasts and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2012; 45: 438-44.
- [50] Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 2010; 19: 279-89.

- [51] Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, Azevedo JM, Reis RL, Gomes ME. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 2012; 8: 1211-22.
- [52] Carvalho KAT, Cury CC, Oliveira L, *et al.* Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. *Transplant Proc* 2008; 40: 839-41.
- [53] Liang C, Li H, Tao Y, *et al.* Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. *J Transl Med* 2012; 10: 49.
- [54] Ercan E, Bagla AG, Aksoy A, *et al.* In vitro protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin. *Acta Histochem* 2014; 116: 117-25.
- [55] Zhang Z, Guan L, Zhang K, *et al.* Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged *in vitro*. *Cell Biol Int* 2007; 31: 645-8.
- [56] Uranio MF, Dell'Aquila ME, Caira M, *et al.* Characterization and *in vitro* differentiation potency of early-passage canine amnion- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age. *Mol Reprod Dev* 2014; 1-13.
- [57] Li Z, Liu C, Xie Z, *et al.* Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *Plos One* 2011; 6(6): 1-9.

GRAPHICAL ABSTRACT

O trabalho verifica o cariótipo e a apoptose celular das CTM-TA e CTM-MO caninas, comparando-as quanto ao índice de viabilidade.



CAPÍTULO 3

Trabalho a ser enviado para a revista “Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology”.

Ausência de efeitos biológicos do laser de baixa potência sobre as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e da medula óssea de cães (*Canis lupus familiaris*)

R E S U M O

O laser de baixa potência (LBP) é muito utilizado em diferentes ramos da medicina regenerativa e odontologia, onde é aplicado para melhorar o processo de cura e é benéfico em uma variedade de processos patológicos, no qual pode aumentar a taxa de proliferação de várias linhagens celulares. No entanto, poucos são os trabalhos que avaliaram os efeitos do LBP em células-tronco mesenquimais (CTM) caninas. Desta forma, os objetivos do presente trabalho são: (1) estudar o efeito do laser de baixa potência fosfato de índio-gálio-alumínio com comprimento de onda de 658 nm e nas densidades de 1,1 e 8,7 J/cm² sobre o cultivo das CTM caninas derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) e da medula óssea (CTM-MO) quanto à proliferação e à viabilidade celular por meio do método de exclusão do azul de tripano, análise da apoptose celular com iodeto de propídio e anexina V e ensaio de unidades formadoras de colônias; (2) verificar a imunogenicidade das CTM-TA e CTM-MO de cães, irradiadas e não irradiadas com o laser de baixa potência, por meio da expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) e (3) avaliar o cariótipo das CTM irradiadas e não irradiadas a fim de comprovar a ausência de alterações cromossômicas com a utilização do LBP. O estudo revelou que o LBP não alterou a viabilidade e a proliferação celular, a expressão de MHC-II e o cariótipo das amostras de CTM-TA e CTM-MO irradiadas e não-irradiadas, apresentando parâmetros semelhantes entre os grupos. Desta forma, pode-se concluir que o LBP não causa efeitos biológicos às CTM-TA e CTM-MO caninas nas dosagens utilizadas de 1,1 e 8,7 J/cm². Portanto, outras dosagens devem ser investigadas para estimular a proliferação das CTM caninas sem causar alterações celulares deletérias.

Palavras-chave: anexina V, azul de tripano, cariotipagem, citometria de fluxo, LLLT, proliferação celular.

1. Introdução

A terapia com as células-tronco mesenquimais (CTM) é um procedimento promissor para o tratamento de diversos tipos de doenças degenerativas [1]. Alguns estudos demonstraram que as CTM do tecido adiposo (CTM-TA) tiveram maior capacidade multipotencial que outros tecidos, como a medula óssea e o sangue do cordão umbilical [2]. Elas são morfológicamente semelhantes às CTM da medula óssea (CTM-MO) ou de outro tecido após serem cultivadas *in vitro*. No entanto, as CTM-MO ou células estromais multipotentes são as células-tronco adultas que foram melhor caracterizadas até hoje [3].

A fototerapia com laser de baixa potência (LBP) a nível celular tem sido alvo de vários estudos ao longo dos anos [4]. A laserterapia pode ser definida como o uso de fontes de LBP e de diodos superluminosos para o tratamento de condições médicas [5]. É uma onda contínua ou luz pulsada que consiste em um feixe constante de relativamente baixa energia (0,04 a 50 J/cm²), o qual é direcionado ao tecido alvo ou células em monocamada usando potências medidas em miliwatts. Um estudo sugere que densidades de 0,5 J/cm² a 4 J/cm² e um espectro de 600 a 700 nm são muito úteis no aumento da proliferação de várias linhagens celulares [6].

O laser é uma forma de radiação eletromagnética no espectro visível ou próximo a ele [5] e surgiu de pesquisas de Einstein em 1917 nos princípios físicos de emissão de luz estimulada [7]. Os princípios necessários ao desenvolvimento do raio laser (“light amplification by stimulated emission of radiation” ou amplificação de luz por emissão estimulada de radiação) surgiram no início do século 20 e, desde então, grande parte do progresso na tecnologia do laser seguiu a pesquisa de armas ou aplicações comerciais nos setores de comunicação e da indústria. Após o término da guerra fria, os fabricantes de laser, antes dedicados a aplicações militares, tomaram iniciativas para o avanço da tecnologia do laser na área médica [8].

O mecanismo básico de ação do LBP é a absorção da luz no tecido irradiado por biomoléculas conhecidas como cromóforos, tipicamente encontrados dentro das mitocôndrias. A energia luminosa é transformada em energia bioquímica e então há uma série de reações secundárias que resultam na modulação de funções celulares e o estímulo de mecanismos de reparação tecidual. Portanto, a absorção da luz é a

chave para a efetividade da laserterapia. [5]. Com a absorção da irradiação, ativa-se o transporte de elétrons na cadeia respiratória e a ocorrência do processo de oxidação, levando a mudanças no estado redox tanto da mitocôndria, quanto do citoplasma, o que pode afetar a permeabilidade de membrana e determinar mudanças na proporção Na^+/H^+ , aumentando os níveis de Na^+ , na atividade da K^+/ATPase e interferindo no fluxo de íons cálcio, envolvido na produção de nucleotídeos, os quais modulam a síntese de DNA e RNA e, finalmente, a proliferação celular [9].

Já foi mostrado que o LBP pode aumentar a taxa de proliferação de várias linhagens celulares em cultura [4,6]. Além disso, o LBP é muito utilizado em diferentes ramos da medicina regenerativa e odontologia, onde é aplicado para melhorar o processo de cura. Ele é benéfico em uma variedade de processos patológicos, incluindo alívio da dor e inflamação, e pode contribuir para a normalização da função hormonal anormal, estimulação da liberação de endorfinas, modulação do sistema imune, aumento da microcirculação, melhora na oxigenação, nutrição e regeneração celular [6].

O LBP pode prevenir a apoptose celular e melhorar a proliferação, migração e adesão celular a níveis baixos de iluminação com luz vermelha ou próximo à infravermelha [6]. Além disso, causa aumento do pH intracelular, que está associado à supressão da apoptose e ao controle da taxa de progressão celular [4]. CTM-TA humanas já foram irradiadas com laser de diodo a um comprimento de onda de 635 nm e densidade de energia de 5 J/cm^2 . Foi verificado aumento na proliferação das células irradiadas, em comparação com o grupo controle [6]. Já em outro estudo, as CTM-MO de camundongos não apresentaram diferenças quanto à proliferação e à diferenciação celular em osteoblastos e osteoclastos com o uso do LBP de 808 nm e densidade de energia de 4 J/cm^2 [10].

Foi relatado que o laser de arseneto de gálio com comprimento de onda de 804 nm aumentou a proliferação de CTM e cardiomiócitos, sem efeitos adversos nas células e não causou nenhuma mudança histopatológica nas células-satélite miogênicas em cultivo. Deste modo, as densidades de energia de 1 e 3 J/cm^2 empregadas neste estudo podem ser utilizadas com segurança para a irradiação das células *in vitro* [11].

Apesar de vários estudos demonstrarem efeitos bioestimulatórios do laser, como o aumento da proliferação e a supressão da apoptose celulares [6], poucos são os trabalhos que avaliaram os efeitos do LBP em CTM caninas [12,13]. Desta forma, os objetivos do presente trabalho são: (1) estudar o efeito do laser de baixa potência fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) com comprimento de onda de 658 nm nas

densidades de 1,1 e 8,7 J/cm² sobre o cultivo das CTM-MO e das CTM-TA caninas quanto à sua proliferação e à viabilidade por meio do método de exclusão do azul de tripano, análise da apoptose celular com iodeto de propídio (IP) e anexina V e ensaio de unidades formadoras de colônias; (2) verificar a imunogenicidade das CTM irradiadas e não irradiadas por meio da expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) e (3) avaliar o cariótipo das CTM irradiadas e não irradiadas a fim de comprovar a ausência de alterações cromossômicas com a utilização do LBP.

2. Materiais e Métodos

2.1. Ética no uso de animais

Todas as etapas do estudo foram conduzidas de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu (protocolo n.94/2013).

2.2. Grupos experimentais

Foram utilizadas um total de 10 amostras para o estudo, sendo cinco amostras de tecido adiposo, provindas de cães adultos submetidos a cirurgias eletivas, e cinco amostras de medula óssea coletadas da tuberosidade maior do úmero de cães adultos hígidos.

A fim de comprovar sua higidez, os animais foram submetidos à colheita de amostra para os seguintes exames laboratoriais:

- sangue total em EDTA para realização de hemograma com contagem de plaquetas;
- soro sanguíneo para determinação da atividade da alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase, proteína total, albumina, globulinas, creatinina e ureia.

De cada fonte de CTM, as amostras foram divididas em 3 grupos:

Grupo 1: células irradiadas com 1,1 J/cm² a cada 24 horas durante 7 dias;

Grupo 2: células irradiadas com 8,7 J/cm² a cada 24 horas durante 7 dias;

Grupo 3: células não irradiadas e submetidas às mesmas condições ambientais dos grupos anteriores (grupo controle).

2.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi desenvolvido de acordo com o esquema da Figura 6.

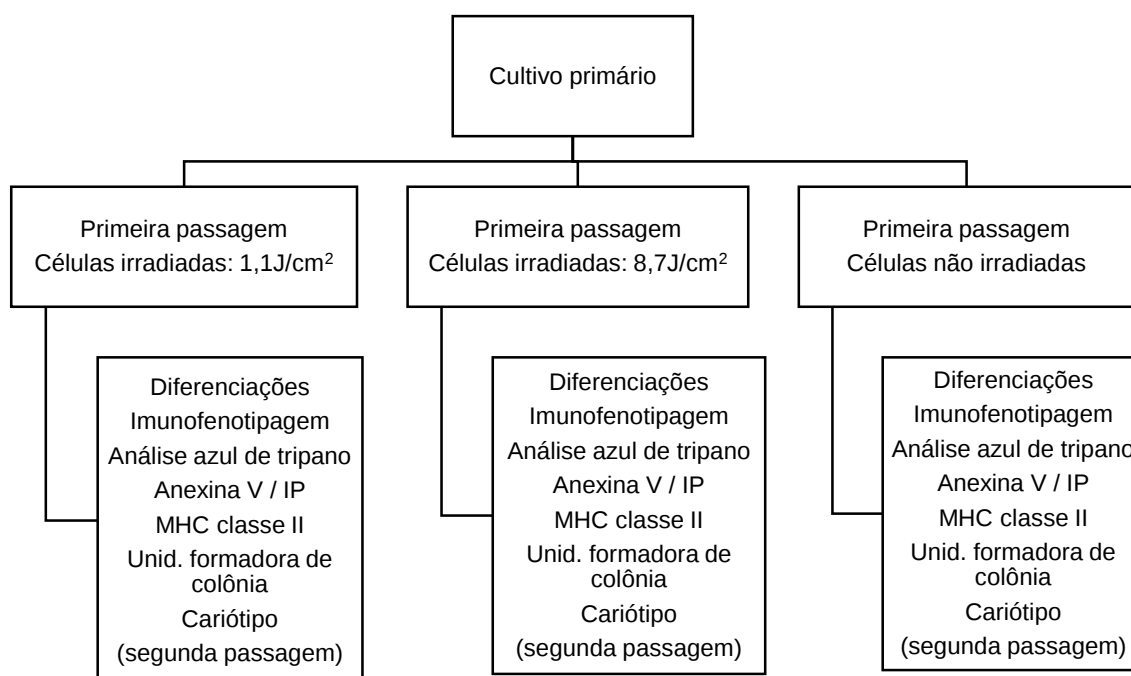


Fig. 6. Delineamento experimental realizado em cada fonte de CTM.

Com outra garrafa do cultivo primário, foi realizada a caracterização das células pela diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica na terceira passagem, bem como a imunofenotipagem com os marcadores de superfície CD34, CD45, CD44, CD90 e CD105 por meio da técnica de citometria de fluxo, também em terceira passagem.

2.4. Colheita das amostras e isolamento das CTM

2.4.1. CTM derivadas do tecido adiposo

Aproximadamente 4 ml de tecido adiposo foi coletado e armazenado em tubo cônico de 50 ml, estéril, contendo Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), ficando completamente submerso.

Para isolar as CTM-TA, o tecido adiposo foi dissecado em pequenos fragmentos (1-2 mm³), lavado com HBSS e digerido com colagenase tipo 1 a 0,04% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). O tubo com o tecido fragmentado foi mantido em banho-maria a 37°C e agitado a cada 10 minutos durante aproximadamente 30 minutos.

Posteriormente, foi realizada neutralização da enzima com o meio de cultivo contendo 90% de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alta glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) (Novafarma, Anápolis, Brasil) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O material foi filtrado com filtro de 70 µm, centrifugado a 340G por 10 minutos, o sobrenadante foi aspirado e acrescido do meio de cultivo e homogeneizado para centrifugação subsequente. Novamente removeu-se o sobrenadante e adicionou-se o meio de cultivo previamente descrito. As células foram contadas em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão do azul de tripano (Invitrogen, São Paulo, Brasil), totalizando uma média de $3,325 \times 10^6$ células, divididas em duas garrafas de 25 cm² contendo 4 mL de meio e cultivadas sob as condições descritas posteriormente.

2.4.2. CTM derivadas da medula óssea

Os cães foram submetidos à medicação pré-anestésica com morfina (Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 0,5 mg/kg por via intramuscular, indução com propofol (Cristália, São Paulo, Brasil) em dose máxima de 5 mg/kg intravenosa e manutenção com isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil) diluído em oxigênio a 100%. O animal foi monitorado por monitor multiparamétrico (eletrocardiograma, oximetria de pulso, capnografia e pressão não-invasiva).

Após a tricotomia e antisepsia da porção cranial proximal do membro torácico, na região correspondente à tuberosidade maior do úmero, foi introduzida a agulha de punção de medula óssea heparinizada e, uma vez bem fixa a agulha no úmero, o mandril foi retirado e procedeu-se a aspiração das células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20mL contendo 1mL de heparina a 1000 UI/mL (Cristália, São Paulo, Brasil).

Em seguida, as amostras da medula foram filtradas em fluxo laminar, com o auxílio de um equipo de transfusão, a fim de remover os coágulos que poderiam estar presentes. Então, o material foi centrifugado a 340G por 10 minutos, sendo o sobrenadante (plasma e gordura) descartado e o material remanescente reservado. Ao material remanescente foi adicionado DMEM alta glicose (Invitrogen, São Paulo, Brasil) na proporção 1:1. Posteriormente, essa mistura foi adicionada lentamente a 4mL de uma solução de polisucrose e diatrizoato de sódio com densidade de 1.077 ± 0.001 g/mL (Histopaque®-1077) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e, em seguida, procedida uma nova centrifugação a 340G por 40 minutos para a obtenção da camada de células mononucleares, onde estão presentes as CTM. A camada de células

mononucleares resultante da centrifugação foi aspirada cautelosamente e acondicionada em um novo tubo, no qual foi acrescido o meio DMEM alta glicose na proporção 1:1. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 340G por 10 minutos para a remoção do Histopaque®-1077 remanescente. O *pellet* de células resultantes foi ressuspensão com o meio DMEM alta glicose (1 mL) e submetido a uma nova centrifugação a 340G por 10 minutos. Após essa centrifugação o sobrenadante foi descartado e ao novo *pellet* formado foi acrescido 2 mL do meio contendo 90% de DMEM alta glicose, 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL). As células foram contadas em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão do azul de tripano, totalizando uma média de $22,20 \times 10^6$ células, divididas em duas garrafas de 25 cm² contendo 4 mL de meio e cultivadas sob as condições descritas posteriormente.

2.5. Cultivo das CTM

As garrafas foram identificadas e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Após as primeiras 48 horas sem manipulação, para que houvesse a adesão celular, o meio dos cultivos foi trocado e as células não aderidas foram descartadas. Após esse período, as garrafas foram monitoradas periodicamente e o meio de cultura foi trocado a cada 3 a 4 dias. A passagem das CTM foi realizada quando se atingiu uma confluência de aproximadamente 80 a 90%. Para isso, foi realizada a tripsinização. Para tal procedimento, o meio de cultivo das garrafas foi descartado, estas foram lavadas com HBSS aquecido a 37°C e acrescidas de 2 mL uma solução de tripsina a 0,25% (Invitrogen, São Paulo, Brasil) a 37°C. As garrafas foram levadas à estufa por 7 minutos para que as células se destacassem da garrafa. Com as células em suspensão, foi adicionado 1 mL de meio de cultivo com 90% de DMEM alta glicose, 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL) para bloqueio da ação da tripsina. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 340G por 10 minutos para a remoção da tripsina. O novo *pellet* formado foi ressuspensão em meio de cultivo, centrifugado novamente e ressuspensão em meio. O conteúdo de uma garrafa do cultivo primário foi dividido para expansão e posterior realização dos testes de diferenciação, viabilidade e imunofenotipagem por citometria de fluxo. O tempo de cultivo primário e de primeira passagem foram registrados em número de dias.

2.6. Diferenciações adipogênica, condrogênica e osteogênica

Para confirmação da linhagem mesenquimal, as células cultivadas foram induzidas a se diferenciarem *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica em terceira passagem. Para tanto, na segunda passagem, as amostras foram tripsinizadas e acondicionadas em placas de 24 poços para diferenciação osteogênica e adipogênica. Para isso, foram utilizados os conjuntos de diferenciação Stempro Adipogenesis® e Stempro Osteogenesis® (Invitrogen, São Paulo, Brasil), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os meios de cultivo foram trocados a cada 3 dias. A demonstração da diferenciação adipogênica e osteogênica foi realizada fixando-se o material com paraformaldeído a 4% (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) e utilizando as colorações histológicas de oil red e alizarin red (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) após 14 e 21 dias, respectivamente. Para a diferenciação condrogênica, um *pellet* de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células e $1,465 \times 10^6$ de CTM-TA e CTM-MO, respectivamente, foi cultivado em um tubo Falcon de 15 mL em 3D, sendo o meio de diferenciação Stempro Chondrogenesis® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) trocado a cada 3 dias, durante 21 dias. A demonstração da diferenciação foi realizada após a fixação com paraformaldeído a 4% e então pelo depósito de matriz cartilaginosa pelas colorações histológicas de alcian blue (pH 2,5) (Merck, Darmstadt, Alemanha), azul de toluidina e hematoxilina-eosina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a partir de lâminas provenientes do *pellet* embocado em parafina.

2.7. Imunofenotipagem

As amostras de CTM-TA e de CTM-MO foram submetidas à análise em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) em segunda passagem para avaliação da expressão dos marcadores de superfície CD34 (mouse anti-human CD34-FITC, Becton Dickinson Company, San Jose, EUA), CD45 (rat anti-dog CD45, Abd Serotec, Raileigh, EUA), CD44 (rat anti-mouse CD44, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), CD90 (mouse anti-human CD90-FITC, Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) e CD105 (mouse anti-human CD105, Abcam, Cambridge, EUA). Para os marcadores primários não conjugados foram utilizados os anticorpos secundários goat anti-rat IgG-FITC (Millipore, Temecula, EUA) e goat anti-mouse IgG-FITC (Abd Serotec, Raileigh, EUA). Todos os anticorpos utilizados possuíam marcação com o fluoróforo FITC. Controles positivos para os marcadores CD34 e CD45 foram executados com o mesmo protocolo, previamente ao experimento, com amostras de

sangue periférico da mesma espécie. Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelos fabricantes de cada um dos anticorpos primários e secundários. As amostras em segunda passagem foram tripsinizadas, lavadas em HBSS e contadas em câmara de Neubauer. Após, foram filtradas em filtro de 70 μm e distribuídas em tubos de poliestireno de fundo redondo contendo aproximadamente 2×10^5 células e incubadas com o anticorpo primário durante uma hora. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos secundários por mais uma hora e então lavadas duas vezes com HBSS. Para as amostras e seus respectivos controles, 20000 eventos foram coletados para análise. Após a análise, os dados foram arquivados para posterior avaliação pelo software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA). Foram utilizados controles isotípicos e secundários adequados às marcações realizadas.

2.8. Protocolos de irradiação com o laser de baixa potência

Os cultivos foram irradiados em segunda passagem com um aparelho de laserterapia marca Laservet[®], utilizando-se o laser vermelho de InGaAlP, com comprimento de onda 658 nm e potência de 50 mW, no modo contínuo. A aferição da potência foi realizada previamente ao experimento, resultando em uma potência real de 54,4 mW. As densidades de energia pretendidas eram de 1 e 8 J/cm² e foram calculadas de acordo com a potência do aparelho e o diâmetro do feixe (0,8 cm²). Desta forma, 40 pontos com tempos de irradiação de 10s e 80s cada foram utilizados para a garrafa de 25 cm².

A irradiação foi realizada manualmente, com a caneta em contato com a superfície inferior das garrafas. Para a realização das sessões, o meio de cultivo foi substituído por HBSS e os cultivos foram protegidos da luz, envoltos em papel preto.

Desta maneira, as aplicações foram realizadas diariamente durante sete dias, nas seguintes dosagens:

Grupo 1: células irradiadas com 1,1 J/cm²;

Grupo 2: células irradiadas com 8,7 J/cm²;

Grupo 3: células não irradiadas e submetidas às mesmas condições dos grupos anteriores (grupo controle).

2.9. Citometria de fluxo

2.9.1. Análise da Apoptose celular com anexina V e iodeto de propídio

A tripsinização das CTM-TA e CTM-MO foi realizada em segunda passagem, dos grupos 1, 2 e 3 no dia 08 (para CTM-TA) e no dia 10 (para CTM-MO) após início da irradiação, sendo marcadas com anexina V e IP, incubadas e analisadas por citometria de fluxo utilizando um citômetro LSR Fortessa (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA). Para esta avaliação, foram utilizadas as sondas anexina V-FITC Kit de apoptose (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) e IP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), de acordo com as recomendações do laboratório. Assim, as amostras foram diluídas em solução tampão de anexina V (10 mM Hepes/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Um volume de 200 μL (concentração final de 2×10^5 células) desta amostra foi colocado em um tubo de cultura de 5 mL e então acrescido de 5 μL de anexina V-FITC e 5 μL de IP (50 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). A amostra foi homogeneizada e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 μL de solução tampão de anexina V para uma concentração final de 5×10^5 células/mL. Um total de 10.000 eventos foi coletado para cada amostra e para o controle negativo. Após a análise, os dados foram arquivados para posterior avaliação pelo software FACSDiva V6,2 (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA). Foram analisadas as populações de células viáveis (IP e anexina negativos), em apoptose precoce (IP negativo, anexina positiva), em apoptose tardia (IP e anexina positivos) e necróticas (IP positivo e anexina negativo) de ambos os tecidos, de acordo com Cho *et al.* [14].

2.9.2. Expressão do antígeno MHC de classe II

A tripsinização das CTM-TA e CTM-MO irradiadas e não irradiadas foi realizada em segunda passagem, sendo marcadas com MHC de classe II, incubadas e analisadas por citometria de fluxo utilizando um citômetro LSR Fortessa (Becton Dickinson Company, San Jose, EUA) nos grupos 1, 2 e 3 no dia 08 (para CTM-TA) e no dia 11 (para CTM-MO). Para esta avaliação, foi utilizado o MHC-II (Abd Serotec, Raileigh, EUA) e o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG-FITC (Abd Serotec, Raileigh, EUA) de acordo com as recomendações do laboratório. Um controle positivo para o marcador foi realizado previamente ao experimento. Após a tripsinização, as amostras foram filtradas em filtro de 70 μm e distribuídas em tubos de poliestireno de fundo redondo contendo aproximadamente 2×10^5 células e incubadas com o anticorpo primário durante uma hora. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário por mais uma hora e então lavadas duas vezes com HBSS. Para as

amostras e seus respectivos controles, um total de 10.000 eventos foi coletado para a amostra e o controle negativo.

2.10. Método de exclusão do azul de tripano

O método de exclusão do azul de tripano foi utilizado para determinação da viabilidade (porcentagem de células viáveis) e proliferação celular (contagem de células totais) dos grupos 1, 2 e 3 no dia 08 (para CTM-TA) e no dia 11 (para CTM-MO) após início da irradiação. As células foram tripsinizadas de acordo com procedimento previamente descrito. Desta solução de células, foi separada uma alíquota de 25 µL em um eppendorf e adicionada a 25 µL de corante de azul de tripano. A solução foi homogeneizada, adicionada ao hemocitômetro com lamínula e preenchido por capilaridade. Após 3 minutos, o hemocitômetro foi observado sob microscopia óptica e foi contado o número de células viáveis e não-viáveis dos quatro quadrantes laterais para determinação da viabilidade e proliferação celular. O número de células foi calculado por meio da seguinte fórmula:

Número de células/mL = média número de células/quadrante x fator de diluição x 10^4

A viabilidade foi calculada pela porcentagem de células viáveis, por meio do cálculo:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{.....células não coradas (viáveis)}}{\text{total de células (coradas + não coradas)}} \times 100$$

2.11. Ensaio de unidades formadoras de colônia (UFC)

Para tal procedimento, foi realizada a contagem de células viáveis, dos grupos 1, 2 e 3, pelo método de exclusão do azul de tripano e semeadas em triplicata em uma placa de 6 poços numa concentração de 50 células viáveis/cm², ou seja, 450 células por poço. Estas foram mantidas em meio com 80% de DMEM alta glicose, 20% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL) durante 7 dias. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 ou 4 dias. Após o período determinado, no oitavo dia, o meio foi retirado, os poços foram lavados com HBSS e as células coradas com Cristal Violeta a

3% em metanol durante 10 minutos. Após, foram lavadas duas vezes com HBSS e observadas sob microscopia óptica para contagem do número de células e de colônias. Foram consideradas colônias o conjunto de 20 células ou mais.

Ainda, foi calculada a eficiência de formação de colônias por meio do cálculo:

$$\text{Eficiência} = \frac{\text{número de colônias}}{\text{número de células semeadas}} \times 100$$

2.12. Análise do Cariótipo

Para verificar qualquer alteração cromossômica após o tratamento das células, foi procedida a análise do cariótipo de amostras dos grupos 1, 2 e 3, em terceira ou quarta passagens, realizada no dia 08 (para CTM-TA) e no dia 11 (para CTM-MO) pós-irradiação. As garrafas com as células em cultivo foram observadas em microscópio invertido (Axiovert Zeiss 40C, Zeiss, Thornwood, EUA) a fim de acompanhar seu crescimento. Às culturas foram acrescidos 50 µL de metotrexato (farmácia de manipulação), cobertas com papel alumínio e mantidas durante 16 horas em estufa a 37°C. Após, foram acrescentados 50 µL de 5-monofosfato de timidina (United States Biochemical Corporation, Cleveland, EUA) e mantidas durante 3,5 horas a 37°C. Em seguida, 100 µL de colchicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) foram acrescidos à cultura e, após 4 horas, as amostras foram ressuspensas com 2 mL de tripsina (Invitrogen, São Paulo, Brasil), centrifugadas a 340 G durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 5 mL de cloreto de potássio às amostras e mantidas durante 20 minutos a 37°C. A hipotonização com o cloreto de potássio foi interrompida com 1 mL de metanol (3:1 em ácido acético glacial 100%) (Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas novamente a 340 G durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 5 mL da mesma solução de metanol. Procedeu-se nova centrifugação (340 G por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado parcialmente, mantendo 1 mL no tubo. Em seguida, as amostras foram gotejadas em lâminas, secas e coradas com coloração de Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha). As lâminas foram então observadas em microscópio óptico e foram analisadas em média 10 metáfases de CTM-TA e 12 metáfases de CTM-MO.

2.13. Análise dos dados

Os resultados da caracterização das células (diferenciações e fenotipagem) e do cariótipo foram analisados por estatística descritiva. Já as análises de ensaio de UFC e sua eficiência, viabilidade e contagem total pelo método de exclusão do azul de tripano, análise da apoptose celular com anexina V e IP e expressão de MHC-II foram comparados entre os grupos dentro de cada tecido (1, 2 e 3).

Inicialmente, a distribuição das variáveis-resposta foi analisada. Devido a presença de graus variados de assimetria e desvios de um padrão Gaussiano de distribuição, o teste de Kruskal-Wallis [15] foi utilizado para comparar cada variável-resposta entre os tratamentos, dentro de cada tecido. A análise estatística foi realizada com o procedimento PROC NPAR1WAY [16] e a significância estatística foi definida como $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Indução das diferenciações adipogênica, condrogênica e osteogênica

As diferenciações nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica foram registradas e encontram-se ilustradas na Fig. 7. Na diferenciação adipogênica, as CTM-TA e CTM-MO apresentaram depósitos lipídicos intracitoplasmáticos corados com oil red após 14 dias de cultivo. Na diferenciação osteogênica, a coloração de alizarin red demonstrou extensos depósitos de cálcio nos cultivos após 21 dias. Já na diferenciação condrogênica, a coloração de alcian blue revelou depósitos de matriz cartilaginosa após 21 dias de cultivo das CTM de ambos os tecidos.

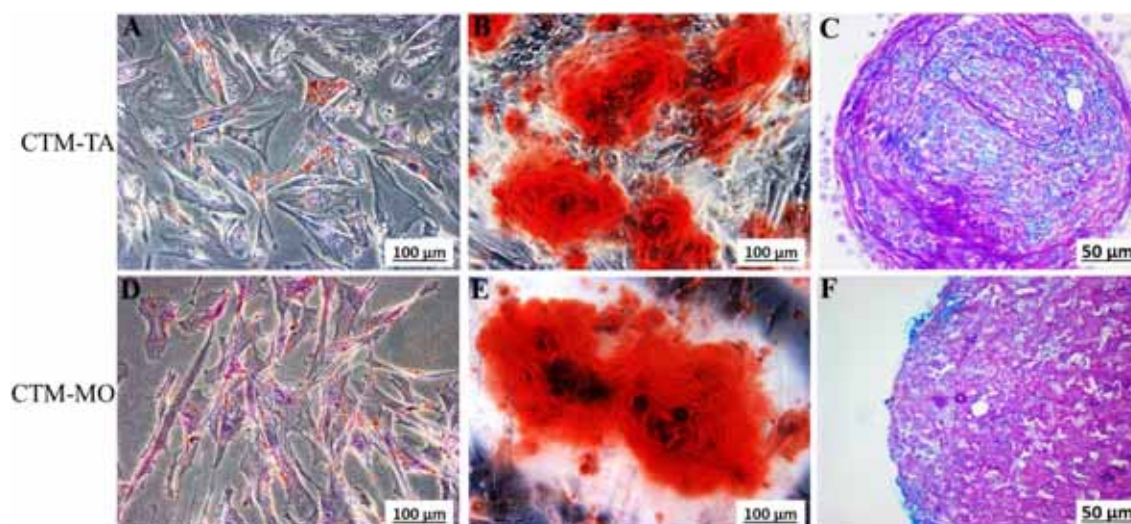


Fig. 7. Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM-TA e CTM-MO. (A) Diferenciação adipogênica das CTM-TA, coradas com oil red; (B) Diferenciação osteogênica das CTM-TA, coradas com alizarin red; (C) Diferenciação condrogênica das CTM-TA, coradas com alcian blue; (D) Diferenciação adipogênica das CTM-MO, coradas com oil red; (E) Diferenciação osteogênica das CTM-MO, coradas com alizarin red; (F) Diferenciação condrogênica das CTM-MO, coradas com alcian blue.

3.2. Imunofenotipagem

As CTM-TA apresentaram medianas de expressão de 0,21% para CD34, 99,66% para CD44, 1,02% para CD45, 95,42% para CD90 e 1,86% para CD105 na citometria de fluxo. Já para as CTM-MO, as medianas foram de 1,33% para CD34, 97,59% para CD44, 3,30% para CD45, 52,51% para CD90 e 2,43% para CD105.

3.3. Citometria de fluxo

3.3.1. Análise da apoptose celular com anexina V e iodeto de propídio

Os resultados da análise de apoptose e viabilidade celular encontram-se ilustrados na Tabela 3 e Fig. 8. Quando comparadas as células viáveis (anexina V e IP negativos), em apoptose precoce (anexina V positiva e IP negativo), em apoptose tardia (anexina V e IP positivos) e necróticas (anexina V negativa e IP positivo) entre os grupos dentro de cada tecido, não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$).

Tabela 3

Mediana (%) da viabilidade das CTM-TA e CTM-MO realizada por citometria de fluxo com as sondas anexina V (An+ representa marcação positiva e An- marcação negativa para anexina V) e iodeto de propídio (IP+ representa marcação positiva e IP- marcação negativa para iodeto de propídio).

TIPO CELULAR	GRUPO	Viáveis An-/IP-	Apoptose precoce An+/IP-	Apoptose tardia An+/IP+	Necróticas An-/IP+
CTM-TA	1 (1,1 J/cm ²)	95,6	3,2	0,5	0,4
	2 (8,7 J/cm ²)	96,9	2,2	0,5	0,5
	3 (controle)	96,5	2,6	0,5	0,5
CTM-MO	1 (1,1 J/cm ²)	96,3	0,7	0,7	2,3
	2 (8,7 J/cm ²)	96,7	0,9	1,1	1,5
	3 (controle)	96,5	0,9	1,1	2,2

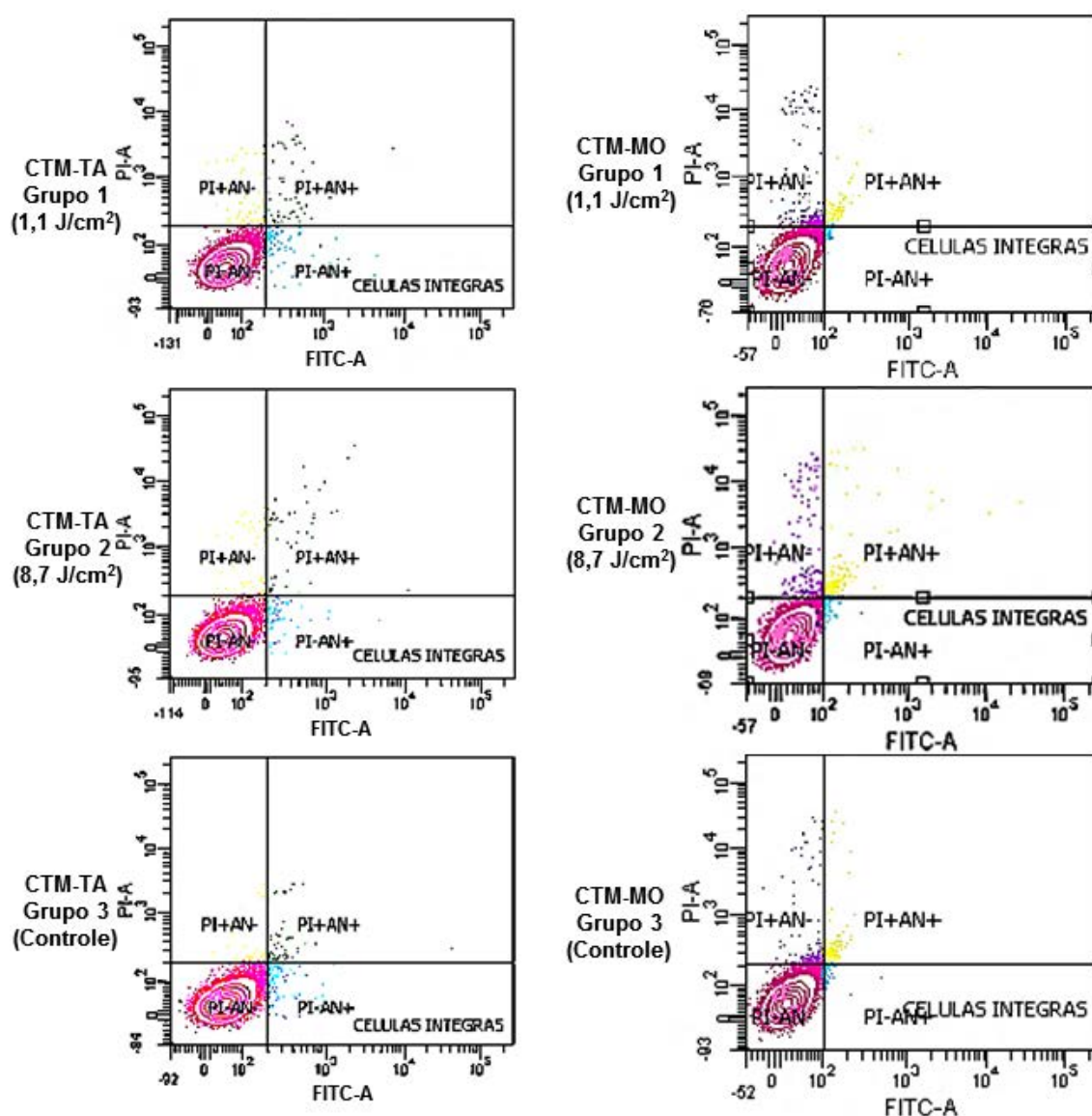


Fig. 8. Gráficos da análise de apoptose celular com anexina V e IP. Dot plot das CTM-TA (esquerda) dos grupos 1 (irradiadas com 1,1 J/cm²), 2 (irradiadas com 8,7 J/cm²) e 3 (controle), com as populações de células viáveis (PI-AN- em rosa), em apoptose precoce (PI-AN+ em azul), em apoptose tardia (PI+AN+ em amarelo) e necróticas (PI+AN- em roxo), seguidos das CTM-MO (direita) do grupo

1 (irradiadas com 1,1 J/cm²), 2 (irradiadas com 8,7 J/cm²) e 3 (controle) com as populações de células viáveis (PI-AN- em rosa), em apoptose precoce (PI-AN+ em azul), em apoptose tardia (PI+AN+ em preto) e necróticas (PI+AN- em amarelo).

3.3.2. Expressão do antígeno MHC de classe II

A análise da expressão de MHC-II revelou não haver diferença estatisticamente relevante entre os grupos 1, 2 e 3 dentro de cada tecido ($P>0,05$). Os resultados da citometria de fluxo podem ser encontrados na Fig. 9.

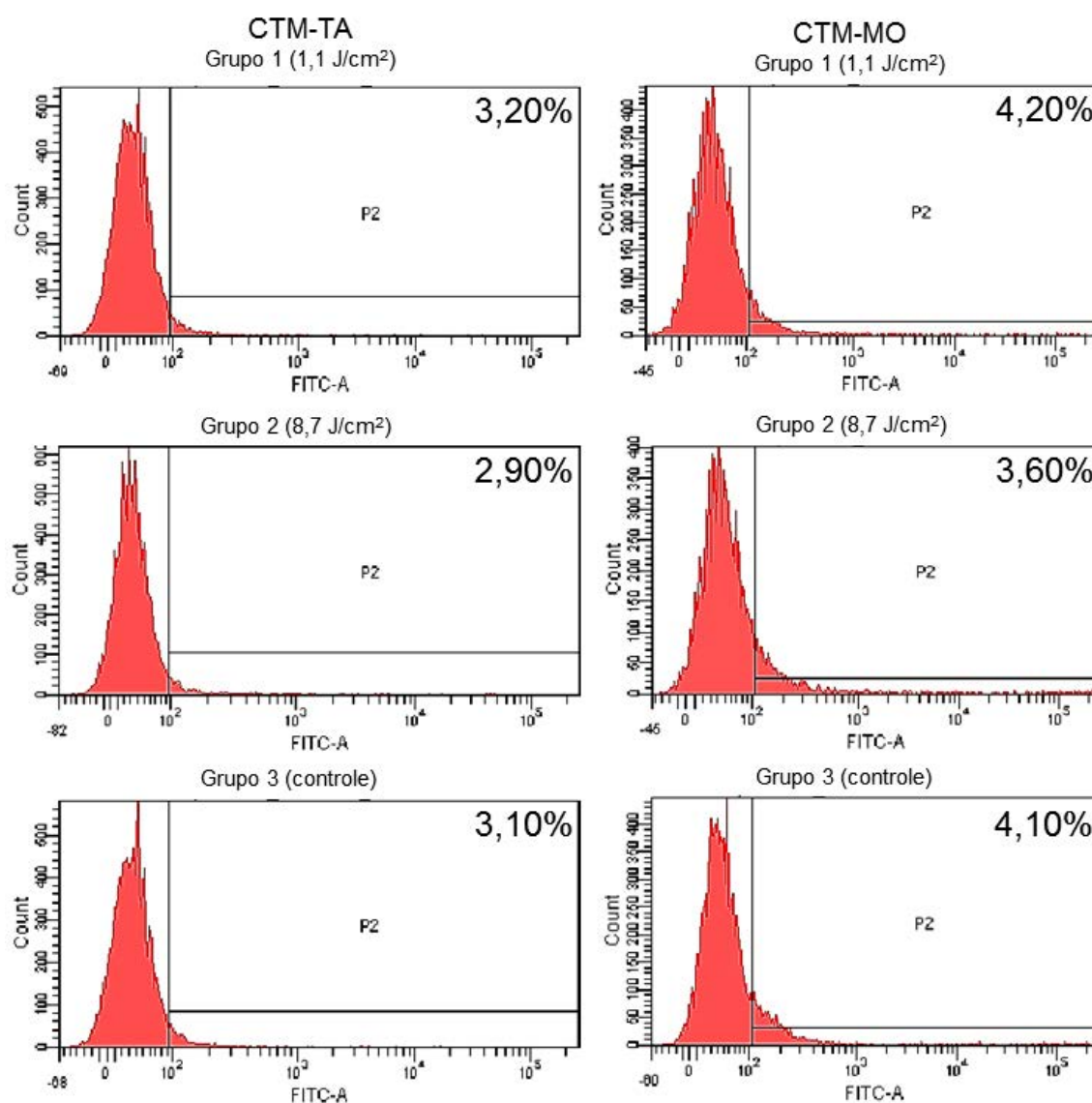


Fig. 9. Expressão do MHC-II nas CTM-TA dos grupos 1, 2 e 3 (à esquerda) e das CTM-MO dos grupos 1, 2 e 3 (à direita).

3.4. Método de exclusão do azul de tripano

O método de exclusão do azul de tripano foi utilizado para determinar a proliferação celular por meio da contagem total de células, bem como a viabilidade dos grupos 1, 2 e 3 das CTM-TA e CTM-MO. A contagem celular total e a viabilidade não apresentaram diferença estatisticamente relevante entre os grupos 1, 2 e 3 dentro de cada tecido ($P>0,05$). Os resultados da contagem total e da viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripano encontram-se apresentados na Tabela 4 e Fig.10.

Tabela 4

Medianas da contagem celular total e viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripano das CTM-TA e CTM-MO dos grupos 1, 2 e 3.

TIPO CELULAR	GRUPO	Contagem celular total	Viabilidade (%)
CTM-TA	1 (1,1 J/cm ²)	3432500	98,29
	2 (8,7 J/cm ²)	3612500	98,60
	3 (controle)	3237500	98,64
CTM-MO	1 (1,1 J/cm ²)	365000	91,00
	2 (8,7 J/cm ²)	405000	92,79
	3 (controle)	642500	95,82

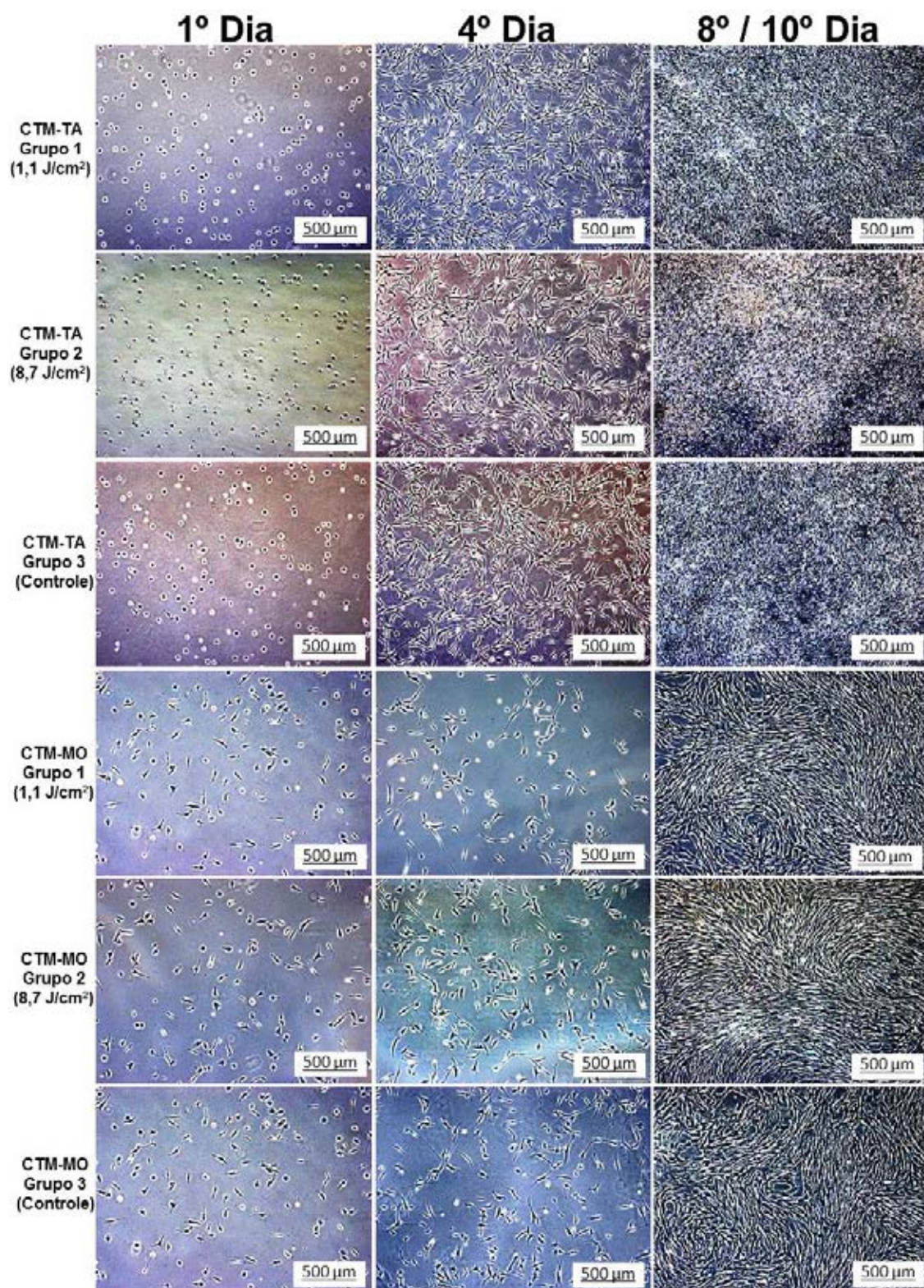


Fig. 10. Demonstração da proliferação celular *in vitro* ao longo do tratamento dos grupos 1 (irradiadas com 1,1 J/cm²), 2 (irradiadas com 8,7 J/cm²) e 3 (controle) com laser de InGaAlP nos momentos primeiro, quarto e oitavo dia nas CTM-TA e o décimo dia nas CTM-MO (dia da avaliação).

3.5. Ensaio de unidades formadoras de colônia (UFC)

Os ensaios de UFC revelaram não haver diferença estatisticamente relevante ($P > 0,05$) entre os grupos (1, 2 e 3) dentro de cada tecido, como pode ser observado na Tabela 5. A realização dos ensaios de UFC está ilustrada na Fig. 11.

Tabela 5

Medianas do número de colônias e da eficiência de formação de colônias dos ensaios de UFC realizados nos grupos 1, 2 e 3 das CTM-TA e CTM-MO.

TIPO CELULAR	GRUPO	Número de colônias	Eficiência formação de colônias (%)
CTM-TA	1 (1,1 J/cm ²)	45,00	10,00
	2 (8,7 J/cm ²)	50,00	11,11
	3 (controle)	43,00	9,56
CTM-MO	1 (1,1 J/cm ²)	48,00	10,67
	2 (8,7 J/cm ²)	45,67	10,15
	3 (controle)	54,67	12,15

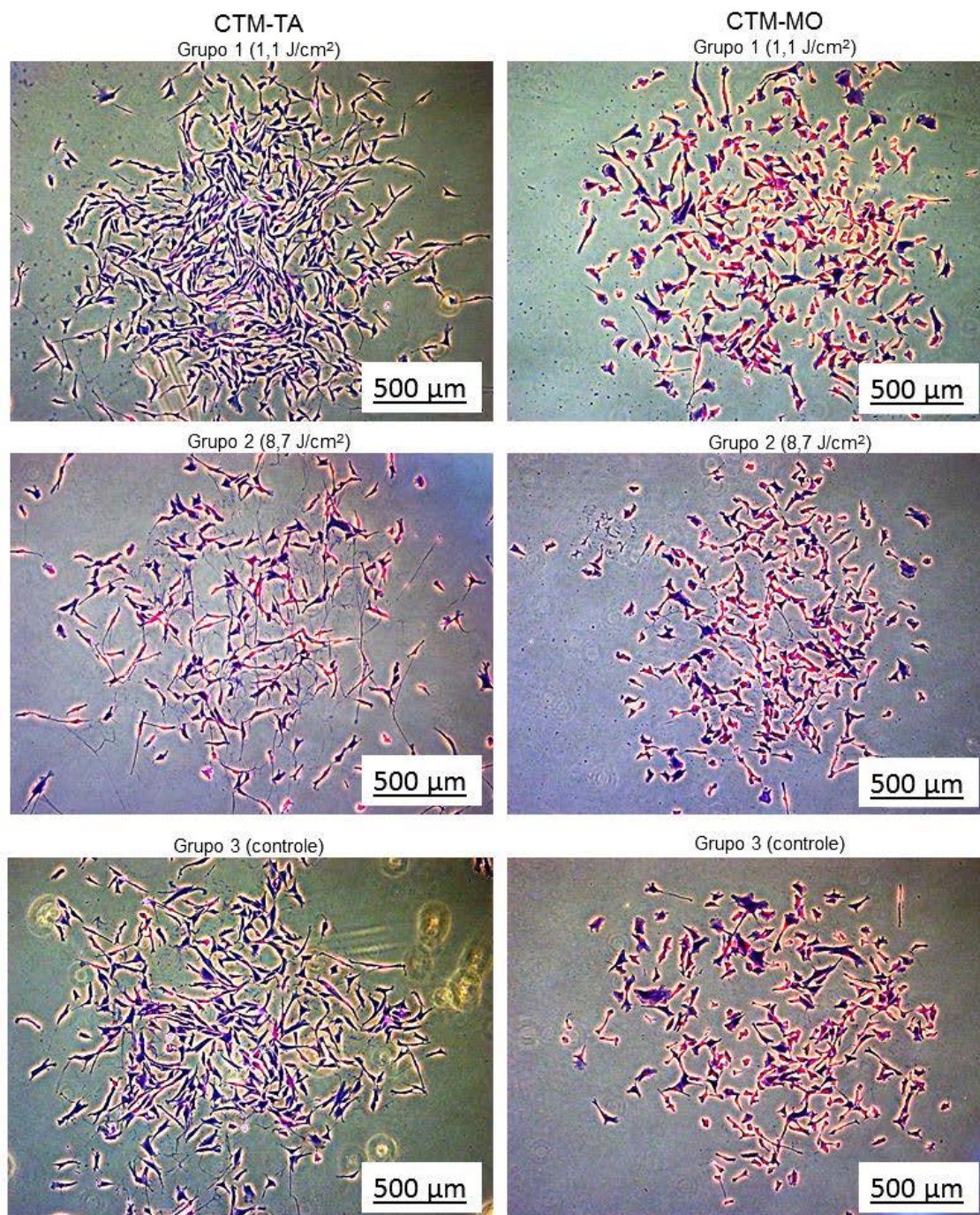


Fig. 11. Colônias encontradas nos ensaios de UFC das CTM-TA do grupo 1 (irradiadas com 1,1 J/cm²), 2 (irradiadas com 8,7 J/cm²) e 3 (controle) (esquerda) e das CTM-MO do grupo 1 (irradiadas com 1,1 J/cm²), 2 (irradiadas com 8,7 J/cm²) e 3 (controle) (direita).

3.6. Análise do cariótipo

As amostras de CTM-TA e CTM-MO analisadas apresentaram cariótipo diploide normal para a espécie ($2n=78$, XX ou XY) e não foram encontradas alterações estruturais cromossômicas (Fig. 12).

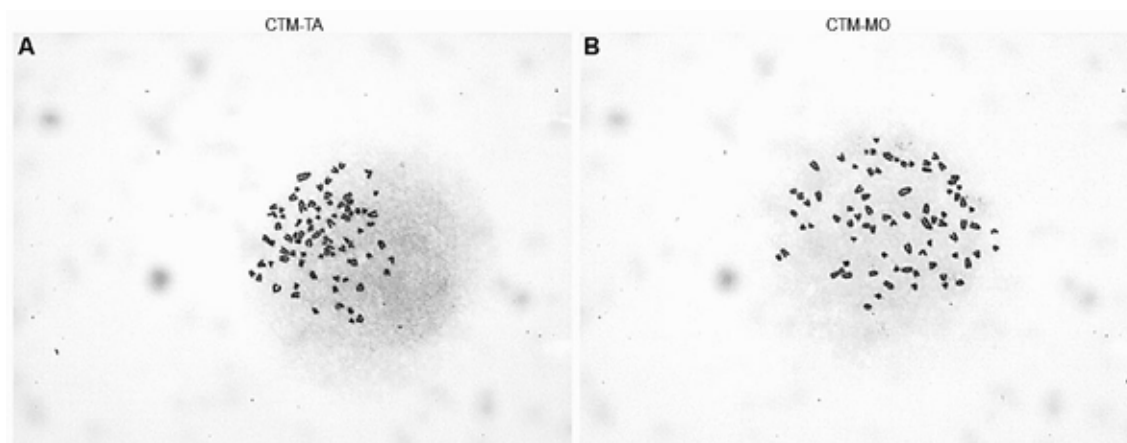


Fig. 12. Cariótipo normal das CTM-TA (A) e CTM-MO (B) caninas ($2n=78$).

4. Discussão

A bioestimulação *in vitro* sofre influência de vários fatores, por exemplo, os parâmetros de irradiação do laser como comprimento de onda, potência de saída e densidade de energia, bem como o tipo de célula irradiada. Portanto, é possível que células em tecidos não respondam ao LBP da mesma forma que em cultivos celulares e que parâmetros semelhantes possam ter efeitos diferentes em diferentes tipos celulares [6].

Por este motivo, estudamos o efeito do LBP sobre as CTM caninas, a fim de verificar se existe o aumento da proliferação nas fluências estabelecidas para posteriormente utilizá-las para transplante, o que é muito útil na medicina regenerativa [6], já que o tratamento precoce é a melhor escolha para o paciente.

No entanto, foi observado um efeito inibitório sobre as células a níveis elevados de energia [4], ressaltando o efeito dose-dependente das respostas biológicas após a exposição luminosa. A maioria dos estudos sugere que a bioestimulação ocorre em densidades de energia entre 0,05 e 10 J/cm², enquanto doses acima de 10 J/cm² possuem efeitos bioinibitórios [6]. Por este motivo, escolhemos densidades dentro desta faixa de energia para nosso estudo.

Os resultados mais efetivos foram verificados pelo uso do espectro visível, variando de 600 a 700 nm [6], o qual foi escolhido em nosso estudo, sendo o laser vermelho de InGaAlP de 658 nm utilizado para o tratamento das CTM. Durante o experimento, alguns cuidados foram tomados para o tratamento das células, como

irradiar as células no escuro e substituir o meio de cultivo por solução tampão de fosfato. Caso contrário, o soro pode interferir com a reação durante a irradiação [11].

Além disso, tanto as CTM-TA quanto as CTM-MO apresentaram aspectos fenotípicos estabelecidos para sua caracterização, como a aderência ao plástico após isolamento, a expressão de marcadores específicos e seu potencial de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* [17].

Dependendo da indicação terapêutica, o uso das células-tronco pode ser mais vantajoso devido à abundância, frequência e potencial de expansão das células, do que na sua capacidade de diferenciação celular [18]. Neste sentido, o aumento da proliferação seria uma vantagem no uso do LBP no cultivo das CTM caninas. No entanto, em nosso estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos dentro de cada tecido quanto à proliferação das CTM, quando utilizado o laser InGaAlP de 658 nm nas densidades de energia de 1,1 e 8,7 J/cm², tanto pelas técnicas de exclusão com azul de tripano, quanto de UFC. Este resultado foi semelhante a outros que utilizaram o LBP na tentativa de aumentar a proliferação celular [19,20,21].

Apesar de vários estudos, a comparação entre os trabalhos é difícil, pois existe um grande número de variáveis, como o uso de diferentes tipos de laser e diferentes tipos celulares e teciduais [22]. Esta dificuldade também surge pela complexidade de escolha entre muitos parâmetros de iluminação, como comprimento de onda, fluência, densidade de potência, estrutura do pulso e tempo de tratamento, o que levou à publicação de muitos estudos negativos e positivos [23].

No estudo de Pereira *et al.* [19], as CTM da polpa dentária foram submetidas ao laser vermelho (660 nm) em quatro fluências diferentes: 0,05, 0,3, 7 e 42 J/cm², que não apresentaram aumento significativo de sua proliferação. As CTM-MO de camundongos foram irradiadas com laser de diodo de 635 nm e tiveram um aumento de sua proliferação em 24 horas, sem modificar a viabilidade celular [24].

Em um estudo, as CTM-MO de camundongos também não apresentaram diferenças quanto à proliferação e à diferenciação celular em osteoblastos e osteoclastos com o uso do LBP de 808 nm e densidade de energia de 4 J/cm² [10]. Hou *et al.* [25] também utilizaram o LBP de 635 nm para melhorar a taxa de proliferação das CTM-MO de ratos com várias densidades de energia. Porém, eles verificaram maior proliferação nos grupos irradiados do que nos grupos não irradiados, com melhores resultados na densidade de 0,5 J/cm². Ainda, verificaram aumento na secreção de fatores de crescimento e maior diferenciação miogênica com 5 J/cm² e não detectaram diferenças de efeitos citotóxicos entre os grupos. Em outro estudo

utilizando CTM-MO de ratos, o LBP de 632 nm foi utilizado na fluência de 0,5 J/cm², o qual estimulou a proliferação no segundo, quarto e sexto dia pós-irradiação [26]. No estudo de Mvula *et al.* [27], as CTM-TA humanas tratadas apresentaram maior proliferação nas 24 e 48 horas após a irradiação com LBP (5 J/cm² em comprimento de onda de 632 nm).

Em CTM de ratos, tratados com laser verde (532 nm) e azul (473 nm) durante 3 dias nas fluências de 1, 2 e 3 J/cm², para ambos os tipos de laser foi observado aumento da proliferação após 144 horas, principalmente no grupo irradiado com 2 J/cm² [28].

Barboza e colaboradores [29] verificaram o aumento da proliferação de CTM-TA e CTM-MO irradiadas em 2 sessões de 0,5 e 1 J/cm², sendo que as primeiras responderam melhor que as últimas, e a densidade de 1 J/cm² foi mais eficiente para ambos os tipos celulares em 24h após a irradiação.

As CTM-TA humanas também já foram irradiadas com laser de diodo a um comprimento de onda de 635 nm e densidade de energia de 5 J/cm². Foi verificado um aumento na proliferação nas células tratadas, em comparação com o grupo controle [6]. Em outro estudo utilizando o LBP (636 nm) na densidade de 5 J/cm² em CTM-TA humanas, houve aumento da proliferação das células irradiadas 24 e 72 horas após a irradiação [30]. Em CTM-TA tratadas com LBP de 680 nm e 830 nm, em três fluências diferentes (5, 10 e 15 J/cm²), somente houve diferença significativa da proliferação nos grupos tratados com o laser de 830 nm com 10 e 15 J/cm², o qual inibiu o crescimento celular [31].

Foi relatado que o laser de arseneto de gálio com comprimento de onda de 804 nm aumentou a proliferação de CTM e cardiomiócitos, sem efeitos adversos nas células e não causou nenhuma mudança histopatológica nas células-satélite miogênicas em cultivo. Deste modo, as densidades de energia de 1 e 3 J/cm² empregadas neste estudo podem ser utilizadas com segurança para a irradiação das células *in vitro*. Estes resultados podem ter um impacto importante na medicina regenerativa [11].

Em um estudo que avaliou o uso do LBP (636 nm) em CTM-TA de humanos na densidade de 5 J/cm², foi verificado aumento da viabilidade nas células irradiadas 24 e 48 horas após a irradiação, com o teste de exclusão do azul de tripano. Às 72 horas, a diferença não foi significativa, comprovando que o LBP não afeta a membrana celular nestes parâmetros e aumenta a viabilidade celular [30]. Quando o LBP foi utilizado nesta mesma densidade e comprimento de onda, foi igualmente verificado aumento da viabilidade das CTM-TA humanas em outro estudo, porém esta diferença não teve

significância estatística [27]. Porém, no estudo de Abrahamse *et al.* [31], as CTM-TA humanas tratadas com LBP de 680 nm e 830 nm em três fluências diferentes (5, 10 e 15 J/cm²) apresentaram menor viabilidade nos três grupos irradiados com LBP de 830 nm.

Esses resultados diferem de nosso estudo, onde a viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripano não apresentou diferenças entre os grupos 1, 2 e 3 dentro de cada tecido. A viabilidade celular não diferiu entre os tecidos no estudo de Uranio *et al.* [32], no qual foram utilizadas CTM da matriz do cordão umbilical e da membrana amniótica. No entanto, diferiu dentro dos grupos, em diferentes passagens, tendo diminuído a viabilidade a partir da quarta e quinta passagens para a membrana amniótica e o cordão umbilical, respectivamente. Mesmo assim, os valores absolutos continuaram relativamente altos. Nas primeiras passagens, as CTM da membrana amniótica apresentaram viabilidade de 92,83% e as do cordão umbilical de 71,40%, valores um pouco inferiores ao das CTM-TA de nosso trabalho, com viabilidades entre 98,29 e 98,64%, e semelhantes às das CTM-MO, com 91 a 95,82%.

Em um estudo de CTM-MO de felinos [33] e de suínos [34], as CTM apresentaram viabilidade de mais de 95%. Em ratos, as CTM-MO apresentaram viabilidade de 94,76% com o método do azul de tripano e 85, 52% com a técnica de marcação com anexina V e análise por citometria de fluxo [35].

Já as CTM-TA humanas apresentaram viabilidade de 94,03% [36], 98,8% [37] e aproximadamente 87% [38] em outros estudos. Em CTM-MO caninas, o índice foi maior em outro trabalho, sendo encontrada viabilidade de 100% [39]. Já em CTM-TA caninas, a viabilidade foi semelhante, com 96 a 100% de células viáveis desde a primeira até a sexta passagem [40]. Um estudo comparou as CTM-TA caninas com fibroblastos, e concluiu que a viabilidade foi maior e o índice de apoptose foi menor nas CTM-TA. Porém, ambos os tipos celulares tiveram viabilidade acima dos 90% [41].

Pode-se utilizar o ensaio de citometria de fluxo com anexina V-FITC e IP para avaliação da viabilidade ou morte celular. Este método permite a discriminação entre células apoptóticas e necróticas [42].

O uso da anexina V é possível em combinação com outros corantes, como o IP e o Hoechst 33342, o que permite a caracterização de estágios progressivos da apoptose. Na maioria dos casos, a translocação da fosfatidilserina (FS) à superfície celular ocorre antes da condensação do DNA, permeabilização da membrana plasmática e formação dos prolongamentos da membrana servindo, portanto, como uma medida rápida e conveniente da apoptose precoce [43].

A translocação da FS para a superfície celular externa não é única da apoptose, mas também ocorre durante a necrose celular. A diferença entre essas duas formas de morte é que, durante as fases iniciais da apoptose, a membrana celular permanece intacta, enquanto que no mesmo momento que a necrose ocorre, a membrana celular perde sua integridade e se torna permeável. Portanto, a mensuração da ligação da anexina V à superfície celular como indicador de apoptose deve ser realizada em conjunto com o IP [42], que detecta a perda da integridade da membrana celular [44].

Quando comparadas as células viáveis, em apoptose precoce, tardia e necróticas entre os grupos dentro de cada tecido, não foram verificadas diferenças significativas.

Um trabalho avaliou a apoptose de CTM-MO de cães da raça beagle e encontraram índices de 4,95% de CTM em apoptose precoce e 1,89% de CTM necróticas [45], índices estes discretamente maiores que os encontrados no presente estudo, que foram de 3,20% de CTM-MO no grupo 1 (irradiadas com 1,1 J/cm²) em apoptose precoce e 0,50% de CTM-MO necróticas nos grupos 2 (irradiadas com 8,7 J/cm²) e 3 (controle).

Um estudo em CTM-TA humanas avaliou o efeito da tensão de oxigênio sobre a viabilidade com o método de marcação com anexina V e IP. A porcentagem de CTM-TA viáveis aumentou de 90% para 95% e diminuiu o número de células necróticas com a redução da tensão de oxigênio [36]. No estudo de Liang *et al.* [37], as CTM-TA humanas coletadas de doadores jovens e idosos tiveram índice de viabilidade semelhantes, resultando em 98,8% de células viáveis e menos de 5% de células apoptóticas e necróticas. Em nosso estudo, a viabilidade das CTM foi semelhante, variando de 95,6% a 96,9%.

Além da viabilidade, o ensaio de UFC também tem sido utilizado para avaliar a sensibilidade à radiação de diferentes linhagens celulares [46]. Os ensaios de UFC fornecem um meio conveniente de avaliar a capacidade proliferativa que retêm as CTM após serem plaqueadas em densidades baixas e expandidas em cultivo [47,48]. Geralmente, cada colônia no ensaio surge de uma única célula. Portanto, o número de UFC obtidas provavelmente reflete o número de CTM ou precursores de CTM em uma amostra. Em amostras com baixos números de CTM formadoras de colônias, as células provavelmente sofrem muitas duplicações antes de atingir confluência na primeira passagem e, portanto, têm um potencial limitado para maior expansão [49].

É importante desenvolver melhores protocolos para o isolamento e caracterização da atividade celular estromal. Uma destas técnicas é justamente o ensaio de UFC [47]. Porém, como existem diversas metodologias para os ensaios de UFC, é difícil a comparação dos dados absolutos. Esta variação ocorre desde a densidade celular

cultivada, o tempo de cultivo, até o tipo de recipiente utilizado para os ensaios [48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64]. Em nosso estudo, utilizamos o protocolo de Mensing *et al.* [59] com modificações. Kamishina *et al.* [58] verificaram que o número de UFC foram variáveis entre as amostras da medula óssea, que pode ter sido influenciado por contaminação com sangue periférico ou pela idade indeterminada dos animais, os quais foram classificados como adultos jovens. Em nosso estudo, alguns cães também não possuíam idade determinada. Sabe-se também que a atividade promotora de crescimento varia entre os lotes de SFB, mas a análise das moléculas responsáveis por estas diferenças ainda não foi realizada [65].

O meio de cultivo também pode influenciar nos resultados da UFC. Em um estudo, os efeitos da composição do meio foram mais aparentes quando as células foram plaqueadas em densidades muito baixas, como 5 células/cm², ao invés de 50 cm² [48], densidade que foi utilizada em nosso estudo.

Já em termos relativos, as CTM de nosso estudo apresentaram em torno de 10% de eficiência de formação de colônias. No estudo de Izadpanah *et al.* [57] com CTM de macaco *Rhesus*, foi observada uma eficiência maior, variando de 35 a 40% da população inicial.

Em cães, as células progenitoras da medula óssea fetal produziram em torno de 17 colônias para cada 1000 células semeadas, as do fígado fetal tiveram uma maior frequência de produção de colônias, com 64 para cada 1000 células semeadas, ao passo que as células progenitoras da membrana amniótica produziram apenas 5 colônias. Esta variação da eficiência na formação de colônias pode refletir a formação do nicho hematopoiético, que ocorre em determinado período da ontogenia em cada tecido [63]. Em outro estudo, as CTM-MO produziram 1 colônia a cada 10⁴-10⁵ CTM semeadas (eficiência de 0,01-0,001%) [61].

Um estudo comparou os ensaios de UFC com CTM-TA e CTM-MO caninas, porém, além das células indiferenciadas, o número de colônias com células diferenciadas para as linhagens adipogênica e osteogênica também foi analisada. Para as células indiferenciadas no cultivo primário, terceira e sexta passagens, não houve diferenças entre os grupos de CTM-TA e CTM-MO [62]. Já Neupane *et al.* [60] encontraram uma eficiência maior de UFC de CTM-TA caninas em um dos meios testados (17,75%). Em nosso estudo, as CTM-TA e CTM-MO não irradiadas apresentaram eficiências menores que essa, com índices de 12,15% e 9,56%, respectivamente. Além disso, o laser não teve efeito sobre as UFC, já que as CTM irradiadas de ambos os tecidos não apresentaram diferença significativa na eficiência de formação de colônias.

Em equinos, um estudo comparou três protocolos de isolamento e cultivo de CTM-MO e revelou não haver diferenças na frequência de CFU entre os protocolos. Porém, detectaram que UFC realizadas no cultivo primário tiveram menor índice que em primeira passagem [51]. Em CTM derivadas da gengiva e periodonto, a eficiência variou entre 13,43% e 18,45%, enquanto que CTM do tecido subcutâneo exibiram uma menor eficiência, de em média 7,59% [59].

Em CTM de ratos, foram observadas eficiências de formação de colônias entre 32 e 34% [55].

As CTM-TA, CTM-MO e CTM da pele de humanos foram capazes de gerar colônias, sendo que o número de colônias das CTM-TA foi menor, em um estudo [50]. Dmitrieva *et al.* [53] relata que a dinâmica de mudanças nas UFC das CTM-TA e CTM-MO humanas diferiram em seu estudo, pois enquanto a frequência de UFC declinou até quatro vezes nas CTM-MO na quarta passagem, nas CTM-TA permaneceram inalteradas até a sétima passagem. DiGirolamo *et al.* [49] também observaram que o número de UFC no cultivo das CTM-MO humanas *in vitro* diminuíram ao longo das passagens. Quando comparadas as CTM derivadas da gengiva e do ligamento periodontal humanas entre si, estas últimas tiveram menor índice de formação de colônias [64]. Os ensaios de UFC não têm sido realizados com sucesso para a detecção de CTM no sangue periférico e do cordão umbilical [47].

Um estudo comparou a eficiência de UFC entre CTM-MO de camundongos e de humanos, onde a eficiência das primeiras variou entre 4,3 a 7,5 colônias para 1×10^5 células semeadas, e nas últimas os valores variaram entre 12,9 e 40,6 colônias para 1×10^5 células semeadas [65].

Nascimento e Callera [66] avaliaram células progenitoras do sangue periférico criopreservadas por longo período quanto à formação de UFC após a irradiação com LBP de 685 nm e concluiu que, dependendo da densidade de energia utilizada, o laser pode aumentar (1 J/cm^2) ou diminuir (2 J/cm^2) o potencial para o crescimento das UFC.

Associado a avanços no conhecimento das células-tronco adultas para seu uso como células doadoras em terapias regenerativas, surgiram alguns achados inesperados e controversos que desafiam dogmas científicos atuais. Um dos dilemas é uma série de observações indicando que as CTM são privilegiadas imunologicamente, aptas a sobreviver e diferenciar em transplantes alogênicos e até mesmo xenogênicos [67].

Estudos sugerem que o transplante alogênico de CTM poderia não ser rejeitado na ausência de imunossupressão e os testes em modelos animais têm fornecido

evidências a favor desta hipótese [1]. Esta hipoimunogenicidade tem grandes implicações na terapia alogênica e existem muitos relatos descrevendo o uso clínico de células alogênicas com pouca evidência de rejeição imune pelo hospedeiro ou doença do enxerto contra hospedeiro [68].

Os mecanismos desta imunotolerância são objetos de intenso estudo, e três mecanismos interrelacionados têm sido citados. As CTM aparentemente não causam rejeição por (1) serem hipoimunogênicas, (2) modularem o fenótipo das células T e (3) imunossuprimirem o ambiente local [67].

Tal imunogenicidade baixa é devida à ausência do antígeno leucocitário de classe II (MHC-II) e de moléculas co-estimulatórias como o CD40, CD80 e CD86 [69]. Em condições basais, as CTM não expressam MHC-II, mas passam a expressar esta molécula após estimulação com interferon alfa [1].

Como as CTM de outras espécies, as CTM caninas não expressam MHC-II quando não estimuladas. No entanto, o estímulo com mediadores inflamatórios, como interferon gama e/ ou fator de necrose tumoral alfa, podem induzir as CTM a expressar MHC-II, moléculas co-estimulatórias e atuarem como células apresentadoras de antígenos [70]. Estudos já demonstraram a presença de expressão do MHC-I [71,72] e a ausência de expressão de MHC-II nas CTM-MO [71], CTM-TA [72,73], CTM do sangue [74] e da matriz do cordão umbilical e da membrana amniótica canina [32]. Em nosso trabalho, tivemos uma expressão baixa de MHC-II, porém esta expressão não apresentou diferenças entre os grupos dentro de cada tecido. Esta baixa expressão pode ser devido aos cultivos não serem compostos exclusivamente por CTM, visto que somente a propriedade de aderência ao plástico não é suficiente para a purificação dos cultivos das CTM [68]. Um estudo verificou a expressão de MHC-II em uma pequena população da fração vascular estromal de cães (10,5%), a qual diminuiu uma vez que as células foram cultivadas [75].

Lange-Consiglio e colaboradores [76] afirmam que as CTM-MO e as CTM da membrana amniótica podem ser usadas para terapia celular alogênica, porém, somente até a quinta passagem, pois após esse período elas começam a expressar o MHC-II.

Casado *et al.* [77] também avaliaram a expressão de MHC classe II, porém na espécie suína, verificando ausência de sua expressão e ausência de diferenças entre os tecidos avaliados (medula óssea, tecido adiposo e sangue periférico).

A estabilidade cromossômica é um fator crítico para determinar a segurança e qualidade das células-tronco [78]. Alguns relatos têm mostrado que existe instabilidade

cromossômica e transformação espontânea em CTM derivadas de diferentes tecidos mantidas em cultivo por longos períodos [79].

A análise do cariótipo é utilizada para identificar marcadores cromossômicos, o gênero e a espécie animal, analisar o número característico de cromossomos de determinada espécie e determinar aneuploidia em linhagens celulares. É um método sensível e fornece informações importantes na confirmação da identidade celular [80].

A cariotipagem é suficiente para identificar alguma alteração estrutural ou numérica dos cromossomos se uma grande área do DNA é afetada [81] e é um indicador confiável para avaliar a estabilidade genética ou transformação *in vitro* das CTM cultivadas [82]. Além disso, as características biológicas das células, especialmente as características genéticas, podem ser modificadas pelas condições do cultivo *in vitro* [83]. Assim, realizamos a análise do cariótipo nas células irradiadas e não irradiadas de ambas as origens teciduais em nosso estudo, não encontrando nenhuma alteração estrutural ou numérica de cromossomos.

O cão (*Canis lupus familiaris*) possui um cariótipo de 38 autossomos e dois cromossomos sexuais. Até recentemente, esse cariótipo era pouco compreendido, pelo grande número de cromossomos, pelo seu tamanho e pela ausência de um padrão claro de bandas R. No entanto, algumas técnicas como a hibridização *in situ* fluorescente auxiliaram na compreensão e descrição do cariótipo canino e de outros canídeos [84].

Em um estudo que utilizou três fontes de laser de diferentes comprimentos de onda, foi verificado que os laser verde e azul induziram a degradação de cromossomos humanos, enquanto que o laser vermelho de 660 nm não causou alterações [85].

As CTM da matriz do cordão umbilical de cães também mostraram cariótipo normal após múltiplas passagens [86]. Em outro estudo, as CTM da matriz do cordão e da membrana amniótica caninas não apresentaram alterações cariotípicas, indicando que a idade gestacional não afeta a estabilidade dos cromossomos durante as primeiras passagens [32]. Ainda, nas células progenitoras mesenquimais de membrana amniótica, medula óssea e fígado fetal de cães também não ocorreram alterações nos cromossomos analisados em sexta passagem [63]. Em passagens precoces e tardias, as CTM-TA mantiveram um cariótipo diploide com 78 cromossomos [87].

Já no estudo de Ock *et al.* [78], as CTM-TA, CTM-MO e CTM da pele apresentaram ploidia acima de 90%, com as CTM-TA (91%) apresentando menor índice que as CTM-MO (99,3%) e CTM da pele (99,2%). Não houve a ocorrência de

CTM haploides nesse estudo, mas sim altas taxas de tetraploides, principalmente das CTM-TA (9% das CTM-TA, 0,7% das CTM-MO e 0,8% das CTM da pele) [78].

Um estudo com CTM-TA humanas estudou sua estabilidade genética ao longo do cultivo *in vitro*. Verificou-se que o cariótipo das CTM-TA manteve-se normal por, pelo menos, 12 passagens [81]. Em outro estudo, as CTM-MO humanas também apresentaram um cariótipo normal por pelo menos 10 passagens [88]. Assim como em nosso trabalho, Zhang *et al.* [82] avaliaram as CTM-MO em terceira passagem, porém na espécie humana, encontrando cariótipos diploides normais, sem aneuploidia ou poliploidia e sem alterações estruturais, como deleção, inversão, translocação ou cromossomos em anel.

Em um trabalho com CTM de derivadas de placenta humana também verificou-se estabilidade genética e cariótipo normal entre a 15^a e a 20^a passagens [89] e também de quatro a seis passagens em outro estudo [90]. As CTM derivadas do fluido amniótico humano foram analisadas após descongelação e também não apresentaram alterações cromossômicas [91]. No entanto, outro estudo com CTM do sangue do cordão umbilical demonstrou várias anormalidades cariotípicas, com múltiplas alterações numéricas e estruturais [92]. Wang *et al.* [93] também relataram o crescimento de uma população de CTM-MO transformada que gerou tumores sólidos em camundongos imunocomprometidos e exibiram aneuploidia e translocações cromossômicas. Os autores sugeriram que tal população poderia ter se desenvolvido em cultivo, ou as células anormais poderiam ter sido isoladas do doador e expandidas *in vitro* [93].

Finalmente, os procedimentos utilizados no presente estudo, embora não tenham causado danos às CTM-TA e CTM-MO caninas, não apresentaram efeitos bioestimulatórios, o que justifica a execução de futuros trabalhos, investigando outros protocolos para auxiliar nas terapias celulares nesta espécie.

5. Conclusão

O laser de baixa potência fosfato de índio-gálio-alumínio não altera a proliferação e a viabilidade celular de CTM-TA e CTM-MO caninas nas fluências utilizadas de 1,1 e 8,7 J/cm².

Ainda, o tratamento utilizado não causa alterações cariotípicas e não modifica a expressão de MHC-II das CTM-MO e CTM-TA.

Desta forma, pode-se concluir que o LBP não causa efeitos biológicos às CTM-TA e CTM-MO caninas nas fluências utilizadas. Portanto, outras dosagens devem ser investigadas para estimular a proliferação das CTM caninas sem causar alterações celulares deletérias.

Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, Laservet® pelo aparelho utilizado no estudo e ao prof. José Pantoja pela execução das análises estatísticas.

Referências

- [1] Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*; São Paulo: Atheneu, 2006.
- [2] Astor DE, Hoelzler MG, Harman R, Bastian RP. Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. *Can J Vet Res* 2013; 77: 177-82.
- [3] Cheng K, Kuo T, Kuo K, Hsiao C. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic Med Biomark Health Sci* 2011; 3: 53-62.
- [4] Alexandratou E, Yova D, Handris P, Kletsas D, Loukas S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1: 547-52.
- [5] Baxter GD, McDonough SM. Principles of electrotherapy in veterinary physiotherapy. In: McGowan CM, Goff L, Stubbs N, Eds. *Animal physiotherapy: assessment, treatment and rehabilitation of animals*. Oxford: Blackwell Publishing 2007; pp.182-4.
- [6] Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 2012; 27: 237-49.
- [7] Silva JP, Silva MA, Almeida APF, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg* 2010; 28: 17-21.
- [8] Bartels KE. Lasers in veterinary medicine – where have we been, and where are we going? *Vet Clin Small Anim* 2002; 32: 495-515.

- [9] Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med* 2005; 36(4): 307-314.
- [10] Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 291-7.
- [11] Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 373-8.
- [12] Kim H, Choi K, Kweon O, Kim WH. Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. *J Dermatol Sci* 2012; 68: 149-56.
- [13] Choi K, Kang B, Kim H, *et al.* Low-level laser therapy promotes the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013; 101: 919-28.
- [14] Cho H, Lee SH, Yoo JJ, Shon Y. Evaluation of cell viability and apoptosis in human amniotic fluid-derived stem cells with cryoprotectants. *Cryobiol* 2014; 68(2): 244-50.
- [15] Pagano M, Gauvreau K. *Principles of Biostatistics*. Belmont: Duxbury Press, 2000.
- [16] SAS Institute. *SAS/STAT User's Guide*: version 9.3. SAS Institute Inc., 2011.
- [17] Dominici M, LeBlanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-7.
- [18] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-301.
- [19] Pereira LO, Longo JPF, Azevedo RB. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. *Arch Oral Biol* 2012; 57: 1079-85.
- [20] Shiba H, Tsuda H, Kajiya M, *et al.* Neodymium-doped yttrium-aluminium-garnet laser irradiation abolishes the increase in interleukin-6 levels caused by peptidoglycan through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in human pulp cells. *J Endod* 2009; 35: 373-6.
- [21] Ferriello V, Faria MR, Cavalcanti BN. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. *J Oral Sci* 2010; 52: 33-8.

[22] Babapour R, Glassberg E, Lask GP. Low-Energy laser systems. Clin Dermatol 1995; 13: 87-90.

[23] Hamblin MR, Deminova TN. Mechanisms of low level light therapy. In: Proceedings of SPIE 6140; 2006 Feb 10; San Jose, California, USA 2006; pp. 1-12.

[24] Gianelli M, Chellini F, Sassoli C, *et al.* Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action. J Cell Physiol 2013; 228: 172-81.

[25] Hou J, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei Y, Hu S. In vitro effects of low level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. Lasers Surg Med 2008; 40: 726-33.

[26] Wu Y, Wang J, Gong D, Gu H, Hu S, Zhang H. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. Lasers Med Sci 2012; 27: 509-19.

[27] Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. Lasers Med Sci 2008; 23: 277-82.

[28] Mancera D, Solarte E, Fierro L, Criollo W. Low power laser and LED irradiation effect on proliferation and differentiation of wistar rats mesenchymal stem cells. Proceedings of SPIE 8785, 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications; 2013 Nov 18; Porto, Portugal. pp. 1-9.

[29] Barboza CAG, Ginani F, Soares DM, Henriques ACG, Freitas RA. Low-level laser irradiation induces *in vitro* proliferation of mesenchymal stem cells. Einstein 2014; 12: 75-81.

[30] Villiers JA, Houreld NN, Abrahamse H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. Stem Cell Rev Rep 2011; 7: 869-82.

[31] Abrahamse H, Houreld NN, Muller S, Ndlovu L. Fluence and wavelength of low intensity laser irradiation affect activity and proliferation of human adipose derived stem cells. Med Technol SA 2010; 24: 15-20.

[32] Uranio MF, Dell'Aquila ME, Caira M, *et al.* Characterization and *in vitro* differentiation potency of early-passage canine amnion- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age. Mol Reprod Dev 2014; 1-13.

[33] Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 2002; 30: 879-86.

[34] Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 2006; 74: 46-57.

[35] Carvalho KAT, Cury CC, Oliveira L, *et al.* Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. *Transplant Proc* 2008; 40: 839-41.

[36] Buravkova LB, Rylova YV, Andreeva ER, *et al.* Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4418-25.

[37] Liang C, Li H, Tao Y, *et al.* Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. *J Transl Med* 2012; 10: 49.

[38] Ercan E, Bagla AG, Aksoy A, *et al.* *In vitro* protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin. *Acta Histochem* 2014; 116: 117-25.

[39] Rezaei M, Jamshidi S, Saffarpour A, *et al.* Isolation, characterization and transduction of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (cBM-MSCs). *Iran J Vet Med* 2013; 7: 193-9.

[40] Patricio LFL, Rebelatto CLK, Brofman PRS, *et al.* Isolamento e caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013; 65: 946-54.

[41] Oh HJ, Park EJ, Lee SY, *et al.* Comparison of cell proliferation and epigenetic modification of gene expression patterns in canine foetal fibroblasts and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2012; 45: 438-44.

[42] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51.

[43] Bossy-Wetzel E, Green DR. Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Meth Enzymol* 2000; 322: 15-8.

[44] Span LFR, Pennings AHM, Vierwinden G, Boezeman JBM, Raymakers RAP, Witte T. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using annexin-V/propidium iodide and a modified *in situ* end labeling technique. *Cytometry* 2002; 47: 24-31.

[45] Lu S, Liu S, Zu Q, *et al.* *In vivo* MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model. *Plos One* 2013; 8(2): 1-10.

[46] Rafehi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp* 2011; 49:1-3.

[47] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-84.

[48] Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation and differentiation potential. *Blood* 2004; 103(5): 1662-8.

[49] DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107: 275-81.

[50] Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, *et al.* Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev Rep* 2013; 9: 32-43.

[51] Bourzac C, Smith LC, Vincent P, Beauchamp G, Lavoie JP, Lavery S. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J* 2010; 42(6): 519-27.

[52] Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J Endod* 2011; 37(8): 1074-80.

[53] Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritskey AY. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Differences and similarities. *Cell Cycle* 2012; 11(2): 377-83.

[54] Gade NE, Pratheesh MD, Nath A, *et al.* Molecular and cellular characterization of buffalo bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Reprod Dom Anim* 2013; 48: 358-67.

[55] Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; 19: 219-25.

[56] Jin HJ, Bae YK, Kim M, *et al.* Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 17986-18001.

[57] Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of Rhesus macaques. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 440-51.

[58] Kamishina H, Farese JP, Storm JA, Cheeseman JA, Clemmons RM. The frequency, growth kinetics and osteogenic/adipogenic differentiation properties of canine bone marrow stromal cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2008; 44(10): 472-9.

[59] Mensing N, Gasse H, Hambruch N, Haeger J, Pfarrer C, Staszky C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Vet Res* 2011; 7(42): 1-13.

[60] Neupane M, Chang C, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2008; 14(6): 1007-15.

[61] Rozemuller H, Prins H, Naaijken B, Staal J, Bühring H, Martens AC. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting anti-human monoclonal antibodies. *Stem Cells Dev* 2010; 19(12): 1911-21.

[62] Spencer ND, Chun R, Vidal MA, Gimble JM, Lopez MJ. In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Vet J* 2012; 191: 231-9.

[63] Wenceslau CV, Miglino MA, Martins DS, *et al.* Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. *Tissue Eng* 2011; 17(17-18): 2165-76.

[64] Yang H, Gao L, An Y, *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. *Biomaterials* 2013; 34: 7033-47.

[65] Kuznetsov SA, Mankani MH, Bianco P, Robey PG. Enumeration of the colony-forming units-fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem Cell Res* 2009; 2: 83-94.

[66] Nascimento RX, Callera F. Low-level laser therapy at different energy densities (0.1-2.0 J/cm²) and its effects on the capacity of human long-term cryopreserved peripheral blood progenitor cells for the growth of colony-forming units. *Photomed Laser Surg* 2006; 24(5): 601-4.

[67] Atoui R, Chiu RCJ. Concise review: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies and unknowns. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(3): 200-5.

[68] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(4): 568-84.

[69] Bonab MM, Yazdanbakhsh S, Lotfi J, *et al.* Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. *Iran J Immunol* 2007; 4(1): 50-57.

[70] Kol A, Foutouhi S, Walker NJ, Kong NT, Weimer BC, Borjesson DL. Gastrointestinal microbes interact with canine adipose derived mesenchymal stem cells *in vitro* and enhance immunomodulatory functions. *Stem Cells Dev* 2014; 1-40.

[71] Kamishina H, Deng J, Oji T, Cheeseman JA, Clemmons RM. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2006; 67(11): 1921-8.

[72] Liu G, Zhang Y, Liu B, Sun J, Li W, Cui L. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials* 2013; 34: 2655-64.

[73] Lee KS, Kang HW, Lee HT, *et al.* Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci* 2014; 96: 267-75.

[74] Seo M, Jeong Y, Park J, *et al.* Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 2009; 10(3): 181-7.

[75] Kiefer KM, Phuvar GE, Conzemius MG, O'Brien TD. The influence of culture medium type on cellular phenotype of canine adipose derived stem cells. *Open J Regen Med* 2014; 3: 28-37.

[76] Lange-Consiglio A, Corradetti B, Meucci A, Perego R, Bizzaro D, Cremonesi F. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: *in vitro* proliferative and multilineage potential assessment. *Equine Vet J* 2013; 45(3): 737-44.

[77] Casado JG, Gomez-Maurício G, Alvarez V, *et al.* Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 147: 104-12.

[78] Ock S, Maeng G, Lee Y, *et al.* Donor-matched functional and molecular characterization of canine mesenchymal stem cells derived from different origins. *Cell Transplant* 2013; 22: 2311-21.

[79] Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, *et al.* Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 2009; 69(13): 5331-9.

[80] Machado JZ, Miranda ACS, Gonçalves CR, Ikeda TI, Cruz AS. Isoenzyme electrophoresis and karyotype techniques as an alternative for cell line identity confirmation. *Virus Rev Res* 2014; 19(1): 1-5.

[81] Ra JC, Shin IS, Kim SH, *et al.* Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev* 2011; 20(8): 1297-308.

[82] Zhang Z, Guan L, Zhang K, *et al.* Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged *in vitro*. *Cell Biol Int* 2007; 31: 645-8.

[83] Mehrabani D, Mahboobi R, Dianatpour M, Zare S, Tamadon A, Hosseini SE. Establishment, culture, and characterization of guinea pig fetal fibroblast cell. *Vet Med Int* 2014; 2014: 1-5.

[84] Galibert F, André C. The dog: a powerful model for studying genotype-phenotype relationships. *Comp Biochem Physiol* 2008; 3(1): 67-77.

[85] Pupples GJ, Olminkhof JHF, Segers-Nolten GMJ, Otto C, Mul FFM, Greve J. Laser irradiation and Raman Spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light. *Exp Cell Res* 1991; 195: 361-7.

[86] Lee KS, Nah J, Lee B, *et al.* Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. *Res Vet Sci* 2013; 94: 144-51.

[87] Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 2010; 19: 279-89.

[88] Zhao Z, Xu W, Yu H, *et al.* Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett* 2012; 317: 136-43.

[89] Macias MI, Grande J, Moreno A, Domínguez I, Bornstein R, Flores AI. Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203(5): 9-23.

[90] Poloni A, Rosini V, Mondini E, *et al.* Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2008; 10(7): 690-7.

[91] Miranda-Sayago JM, Fernandez-Arcas N, Benito C, Reyes-Engel A, Herrero JR, Alonso A. Evaluation of a low cost cryopreservation system on the biology of human amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells. *Cryobiology* 2012; 64: 160-6.

[92] Manca MF, Zwart I, Beo J, *et al.* Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2008; 10(1): 54-68.

[93] Wang Y, Huso DL, Harrington J, *et al.* Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005; 7(6): 509-19.

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

A existência das CTM nos cultivos celulares é comprovada por algumas características, como a aderência ao plástico após isolamento, a expressão de marcadores específicos e o seu potencial de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006). Em nosso estudo, as amostras de tecido adiposo e da medula óssea foram facilmente coletadas e os protocolos para isolamento e expansão das CTM-TA e CTM-MO foram eficientes e reprodutíveis, sendo necessários até 16 dias para expansão das células no cultivo primário e até 7 dias em primeira passagem. Estes números foram semelhantes aos relatados na literatura, a qual cita que os cultivos primários de CTM geralmente são mantidos por 10 a 16 dias até que atinjam confluência (CASADO *et al.*, 2012; BARRY e MURPHY, 2004). Elas apresentaram morfologia fibroblastoide e aderência ao plástico quando em cultivo, assim como em outros estudos (BARRY e MURPHY, 2004; BOSCH *et al.*, 2006; CSAKI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2014; OH *et al.*, 2011; REZAEI *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2014; SPENCER *et al.*, 2012; THARASANIT *et al.*, 2011; VOLK *et al.*, 2012).

Ainda, para demonstração das características multipotenciais das CTM-TA e CTM-MO, estas foram induzidas a se diferenciar nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, as quais já foram demonstradas em CTM provenientes de diversos tecidos de cães, como veia umbilical (ZUCCONI *et al.*, 2010) medula óssea (CSAKI *et al.*, 2007; CHUNG *et al.*, 2012; GROZA *et al.*, 2012; KAMISHINA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2012; LIAO *et al.*, 2011; MEIRELLES e NARDI, 2003; REZAEI *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2014; SPENCER *et al.*, 2012; TAKEMITSU *et al.*, 2012; THARASANIT *et al.*, 2011; VOLK *et al.*, 2012; WENCESLAU *et al.*, 2011; OCK *et al.*, 2013), tecido adiposo (CHUNG *et al.*, 2012; SCHWARTZ *et al.*, 2011; SCHWARTZ *et al.*, 2012; SPENCER *et al.*, 2012; KIEFER *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014; MARTINELLO *et al.*, 2011; NEUPANE *et al.*, 2008; OH *et al.*, 2011; OCK *et al.*, 2013; PATRICIO *et al.*, 2013; TAKEMITSU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013), sangue periférico (HUSS *et al.*, 2000), sangue do cordão umbilical (GROZA *et al.*, 2012), derme

(OCK *et al.*, 2013), polpa dentária (DISSANAYAKA *et al.*, 2011), fígado fetal e saco vitelino (WENCESLAU *et al.*, 2011).

Também foram observadas diferenciações espontâneas nos controles de ambos os tecidos, as quais foram descritas previamente para células da linhagem mesodermal (CADDICK *et al.*, 2006) (Figura 13). Wenceslau *et al.* (2011) detectaram discreta diferenciação osteogênica em cultivos de células progenitoras mesenquimais caninas cultivadas a partir de saco vitelino, medula óssea e fígado fetais. Diferenciação adipogênica espontânea foi observada em estudos de CTM-MO coletadas de suínos (VACANTI *et al.*, 2005) e de camundongos (MEIRELLES *et al.*, 2003). Diferenciação condrogênica discreta e diferenciação osteogênica foram observadas em cultivos de CTM de sangue periférico e de CTM-MO de equinos (GIOVANINNI *et al.*, 2008). Em CTM-MO de bovinos também foi observada diferenciação condrogênica espontânea, porém foi relatado que, em outras espécies, tal diferenciação tem ocorrência esporádica (BOSNAKOVSKI *et al.*, 2004; BOSNAKOVSKI *et al.*, 2005).

Diferenciação osteogênica espontânea também foi observada em cultivos de CTM-MO humanas em passagens tardias, que pode indicar a presença de citocinas ou outros fatores no SFB do meio de cultivo, os quais as selecionam para precursores de osteoblastos. Portanto, algumas CTM podem tornar-se especializadas em uma linhagem ou iniciar a senescência (DIGIROLAMO *et al.*, 1999).

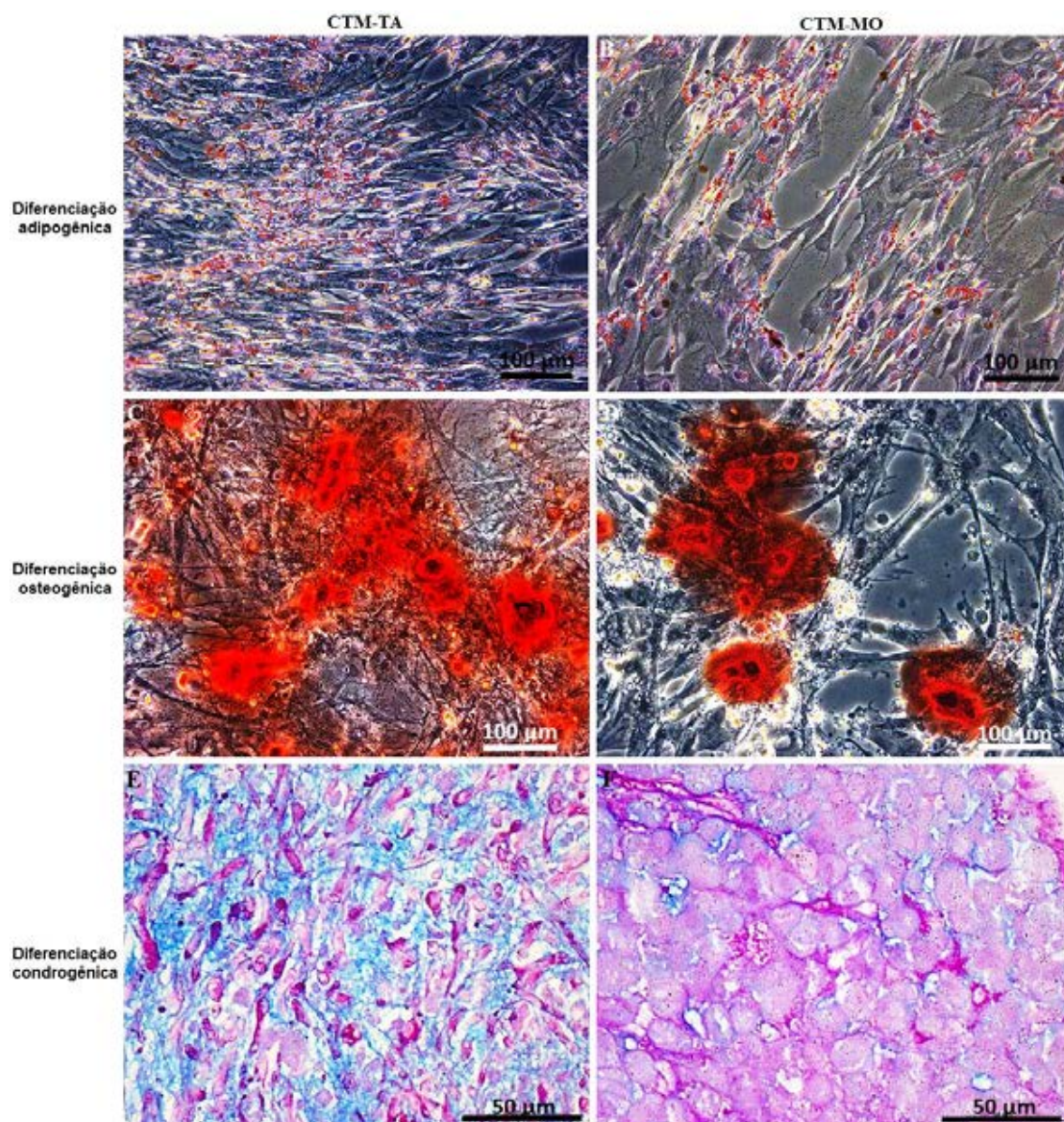


FIGURA 13. Diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica espontâneas das CTM-TA e CTM-MO mantidas em meio DMEM, SFB, antibiótico e antimicótico. (A) Diferenciação adipogênica das CTM-TA demonstrada pela coloração de oil red; (B) Diferenciação adipogênica das CTM-MO demonstrada pela coloração de oil red; (C) Diferenciação osteogênica das CTM-TA demonstrada pela coloração de alizarin red; (D) Diferenciação osteogênica das CTM-MO demonstrada pela coloração de alizarin red; (E) Diferenciação condrogênica das CTM-TA demonstrada pela coloração de alcian blue; (F) Diferenciação condrogênica das CTM-MO demonstrada pela coloração de alcian blue.

Quanto à imunofenotipagem, tanto as CTM-TA quanto as CTM-MO apresentaram alta expressão de CD44 e expressão negativa de CD34, CD45 e CD105. O CD90 teve alta expressão nas CTM-TA, enquanto as CTM-MO tiveram expressão moderada. Estes resultados diferem de Ock *et al.* (2013), no qual as CTM-MO e as CTM derivadas da derme não expressaram CD45, enquanto que as CTM-TA tiveram baixa expressão. Já para o CD90 e CD105, as CTM das três fontes tiveram igualmente expressão positiva. No entanto, o método de avaliação de Ock *et al.* (2013) foi qualitativo, visto que foi realizada pela técnica de imunofluorescência. Esta técnica também foi utilizada em outro trabalho, onde as CTM-MO expressaram CD90 e CD105 e não expressaram CD34 e CD45 (CSAKI *et al.*, 2007). Outro estudo demonstrou, por citometria de fluxo, que as CTM-TA não expressaram CD34 e CD45 e apresentaram marcação positiva para CD44 e CD90, porém este último em porcentagem mais baixa que o presente estudo (25%) (MARTINELLO *et al.*, 2011) e o de Kim *et al.* (2014). Nossos resultados são semelhantes aos de Lee *et al.* (2014), onde as CTM-TA apresentaram marcação positiva para CD44 (98,2%) e CD90 (89,6%) e negatividade para CD34. Em outros estudos, as CTM-TA tiveram expressão negativa para CD34 e CD45 e positiva para CD44, CD90 (KIEFER *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2013) e CD 105 (OH *et al.*, 2012). Em outro estudo com CTM-MO, a expressão do CD44 foi positiva enquanto que do CD90 e do CD45 foi negativa (WENCESLAU *et al.*, 2011).

Cheng *et al.* (2011) afirma que as CTM-TA humanas devem expressar CD44, CD90 e CD105 e não expressar os marcadores das linhagens hematopoiética e endotelial CD31, CD34 e CD45. Porém, em cultivos primários de CTM-TA caninos, Oh *et al.* (2011) verificaram somente 6% de positividade para o marcador CD105 e sua expressão foi negativa nos estudos de Kim *et al.* (2014), Kiefer *et al.* (2014), Vieira *et al.* (2010) e Lee *et al.* (2014). Neste último, o CD105 foi negativo em passagens mais tardias, demonstrando que os marcadores de CTM (CD90 e CD105) diminuíram sua expressão ao aumentar o tempo de cultivo. Outros autores também verificaram diminuição da expressão de CD90 e CD105 ao longo das passagens, pela técnica de RT-PCR (REQUICHA *et al.*, 2012).

Em um estudo de CTM derivadas da polpa dentária de cães, houve expressão negativa para CD45 e CD105, e baixa expressão positiva para CD90 (3,6%) (DISSANAYAKA *et al.*, 2011). Em um estudo realizado com CTM de suínos, os marcadores de superfície das CTM-TA, CTM-MO e CTM de sangue periférico não apresentaram diferenças em sua expressão (CASADO *et al.*, 2012). No entanto, Barry e Murphy (2004) afirmam que somente a propriedade de aderência ao plástico não é suficiente para a purificação dos cultivos das CTM-MO murinas, nas quais foi verificada persistência do marcador CD45.

A fototerapia com LBP a nível celular tem sido alvo de vários estudos ao longo dos anos (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002). A laserterapia pode ser definida como o uso de fontes de LBP e de diodos superluminosos para o tratamento de condições médicas (BAXTER e McDONOUGH, 2007). Já foi comprovado que o LBP pode aumentar a taxa de proliferação de várias linhagens celulares em cultura (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002; ALGHAMDI *et al.*, 2012) e é muito utilizado em diferentes ramos da medicina regenerativa e odontologia, onde é aplicado para melhorar o processo de cura (ALGHAMDI *et al.*, 2012).

No entanto, poucos são os trabalhos que avaliaram os efeitos do LBP em CTM caninas (KIM *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2013). Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram: caracterizar as CTM-TA e CTM-MO caninas, estudar o efeito do laser de baixa potência InGaAlP nas densidades de 1,1 e 8,7 J/cm² sobre o cultivo das mesmas quanto à proliferação e à viabilidade celular, à imunogenicidade por meio da expressão do MHC-II e avaliar o cariótipo das células irradiadas e não irradiadas a fim de comprovar a ausência de alterações cromossômicas com a utilização do LBP.

Para o protocolo de irradiação, a superfície da garrafa foi medida e a energia calculada de acordo com o diâmetro do feixe de laser (0,8 cm² de diâmetro) e a potência de saída do aparelho. Desta forma, 40 pontos foram utilizados para a garrafa de 25 cm² e o tempo de irradiação foi dividido entre estes pontos. É importante ressaltar que a emissão laser é uma radiação colimada, portanto a área irradiada é semelhante à área de saída do laser do aparelho (PEREIRA *et al.*, 2012).

Já para a realização da contagem total de CTM, realizamos estudos-piloto, no qual semeamos 200.000 células por garrafa (25 cm²). No entanto, em tal concentração, as CTM entravam em confluência antes dos 7 dias, não sendo possível a realização do tratamento completo com o LBP sem a necessidade de executar a passagem das células. Como a tripsinização poderia ser um fator que pudesse interferir na dinâmica celular, optamos por semear as células em uma concentração menor, que foi adequada com 100.000 células por garrafa.

Na contagem total após os 7 dias de tratamento, visualmente, foi observada diferença entre as CTM irradiadas e não-irradiadas, principalmente nos grupos das CTM-TA, nos quais as contagens eram maiores principalmente no grupo 2, com o maior nível de irradiação, como pode ser observada na Tabela 6. Porém, tal diferença não foi detectada na análise estatística, provavelmente pela grande variabilidade entre as amostras, com diferentes níveis clonogênicos, e também pelo número de animais testados.

TABELA 6. Contagem celular total das células irradiadas e não-irradiadas pela técnica de exclusão do azul de tripano

AMOSTRA	GRUPO 1 (1,1 J/cm²)	GRUPO 2 (8,7 J/cm²)	GRUPO 3 (controle)
CTM-TA Amostra 1	672500	2097500	545000
CTM- TA Amostra 2	1857000	1920000	1695000
CTM- TA Amostra 3	5465000	6325000	6032500
CTM- TA Amostra 4	3432500	3612500	3237500
CTM- TA Amostra 5	3715000	4365000	3872500
CTM- MO Amostra 6	365000	405000	377500
CTM- MO Amostra 7	265000	217500	175000
CTM- MO Amostra 8	1332500	1492500	2285000
CTM- MO Amostra 9	235000	392500	642500
CTM- MO Amostra 10	1250000	1247500	1197500

No grupo das CTM-MO, algumas modificações foram necessárias para o bom andamento das avaliações. Após o tratamento com LBP, foram necessários alguns dias adicionais para obter um número suficiente e necessário para todas as avaliações. Este foi o principal motivo pelo qual não comparamos a contagem celular entre as CTM-TA e CTM-MO, pois tiveram

protocolos (tempo de cultivo após irradiação) diferentes e dinâmicas de crescimento diferentes.

Um número adequado de células-tronco é requerido para aplicações clínicas porque sua eficácia é limitada no microambiente patológico do hospedeiro, mesmo quando transplantadas em número muito elevado. A cultura celular é uma das técnicas mais úteis na ciência, porém a taxa de crescimento de algumas células de mamíferos é muito lenta (ALGHAMDI *et al.*, 2012). Neste sentido, o aumento da proliferação seria uma vantagem no uso do LBP no cultivo das CTM caninas. No entanto, em nosso estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos 1, 2 e 3 dentro de cada tecido quanto à proliferação das CTM, quando utilizado o laser InGaAlP de 658 nm nas densidades de energia de 1,1 e 8,7 J/cm², tanto pela técnica de exclusão com azul de tripano, quanto de ensaio de UFC. Este resultado foi semelhante a outros que utilizaram o LBP na tentativa de aumentar a proliferação celular (PEREIRA *et al.*, 2012; SHIBA *et al.*, 2009; FERRIELLO *et al.*, 2010).

As CTM-TA humanas também já foram irradiadas com laser de diodo a um comprimento de onda de 635 nm e densidade de energia de 5 J/cm². Foi verificado um aumento na proliferação nas células tratadas, em comparação com o grupo controle (ALGHAMDI *et al.*, 2012). Confirmando este achado, outro estudo utilizou o LBP (636 nm) na densidade de 5 J/cm² em CTM-TA humanas e obteve aumento da proliferação das células irradiadas 24 e 72 horas após a irradiação (VILLIERS *et al.*, 2011). Em CTM-TA tratadas com LBP de 680 nm e 830 nm em três fluências diferentes (5, 10 e 15 J/cm²) somente houve diferença significativa da proliferação nos grupos tratados com o laser de 830 nm com 10 e 15 J/cm², o qual inibiu o crescimento celular (ABRAHAMSE *et al.*, 2010).

Apesar de vários estudos, a comparação entre os trabalhos é difícil, pois existe um grande número de variáveis, como o uso de diferentes tipos de laser, e diferentes tipos celulares e teciduais (BABAPOUR *et al.*, 1995). Esta dificuldade também surge pela complexidade de escolha entre muitos parâmetros de iluminação, como comprimento de onda, fluência, densidade de

potência, estrutura do pulso e tempo de tratamento, o que levou à publicação de muitos estudos negativos e positivos (HAMBLIN e DEMINOVA, 2006).

Em nosso estudo, utilizamos o protocolo de UFC de Mensing *et al.* (2011) com modificações, já que nossos estudos-piloto revelaram que as CTM caninas geravam colônias de mais de 20 células em 7 dias. Em tais estudos, utilizamos diferentes densidades de células (50, 100, 150 e 200 células/cm²) em diferentes tempos de cultivo (7, 10 e 14 dias). Aos 14 dias, como no estudo de referência, as colônias já estavam praticamente confluentes (principalmente os ensaios com 150 e 200 células/cm²) e sua contagem já não era mais possível e, conseqüentemente, também o cálculo de sua eficiência. Com 7 dias de cultivo, na menor densidade testada, a contagem foi executada com sucesso e o método mostrou-se adequado para nosso trabalho.

As contagens de UFC foram primeiramente realizadas macroscopicamente, sobre um fundo branco, e em seguida as placas foram visualizadas no microscópio a fim de verificar as colônias menores que não eram visíveis a olho nu, porém que possuíam mais de 20 células.

Os ensaios de UFC também fornecem um meio conveniente de avaliar a capacidade proliferativa que retêm as CTM após serem plaqueadas em densidades baixas e expandidas em cultivo (DEANS e MOSELEY, 2000; PEISTER *et al.*, 2004).

Porém, como existem diversas metodologias para os ensaios de UFC, é difícil a comparação dos dados absolutos. Esta variação ocorre desde a densidade celular cultivada, o tempo de cultivo e até mesmo o tipo de recipiente utilizado para os ensaios (BOURZAC *et al.*, 2010; DIGIROLAMO *et al.*, 1999; DISSANAYAKA *et al.*, 2011; DMITRIEVA *et al.*, 2012; GADE *et al.*, 2013; JAVAZON *et al.*, 2001; JIN *et al.*, 2013; IZADPANAH *et al.*, 2005; KAMISHINA *et al.*, 2008; MENSING *et al.*, 2011; NBAHEEN *et al.*, 2013; NEUPANE *et al.*, 2008; PEISTER *et al.*, 2004; ROZEMULLER *et al.*, 2010; SPENCER *et al.*, 2012; WENCESLAU *et al.*, 2011; YANG 2013).

Kamishina *et al.* (2008) verificaram que o número de UFC foi variável entre as amostras da medula óssea, que pode ter sido influenciado por contaminação com sangue periférico ou pela idade indeterminada dos animais, os quais foram classificados como adultos jovens. Em nosso estudo, alguns

cães também não possuíam idade determinada. Sabe-se, também, que a atividade promotora de crescimento varia entre os lotes de SFB, mas a análise das moléculas responsáveis por estas diferenças ainda não foi realizada (KUZNETSOV *et al.*, 2009).

O meio de cultivo também pode influenciar nos resultados de UFC. Em um estudo, os efeitos da composição do meio foram mais aparentes quando as células foram plaqueadas em densidades muito baixas como 5 células/cm², ao invés de 50 cm² (PEISTER *et al.*, 2004), densidade esta que foi utilizada em nosso estudo.

Já em termos relativos, as CTM de nosso estudo apresentaram em torno de 10% de eficiência de formação de colônias. No estudo de Izadpanah *et al.* (2005) com CTM de macaco *Rhesus*, foi observada uma eficiência maior, variando de 35 a 40% da população inicial.

Em cães, as células progenitoras da medula óssea fetal produziram em torno de 17 colônias para cada 1000 células semeadas, as do fígado fetal tiveram uma maior frequência de produção de colônias, com 64 para cada 1000 células semeadas, enquanto que as células progenitoras da membrana amniótica produziram apenas 5 colônias. Esta variação da eficiência na formação de colônias pode refletir a formação do nicho hematopoiético, que ocorre em determinado período da ontogenia em cada tecido (WENCESLAU *et al.*, 2011). Em outro estudo, as CTM-MO produziram 1 colônia a cada 10⁴-10⁵ CTM semeadas (eficiência de 0,01-0,001%) (ROZEMULLER *et al.*, 2010).

Um estudo comparou os ensaios de UFC com CTM-TA e CTM-MO caninas, porém, além das células indiferenciadas, o número de colônias com células diferenciadas para as linhagens adipogênica e osteogênica também foi analisado. Para as células indiferenciadas no cultivo primário, terceira e sexta passagens, não houve diferenças entre os grupos de CTM-TA e CTM-MO (SPENCER *et al.*, 2012). Já Neupane *et al.* (2008) encontraram uma eficiência maior de UFC de CTM-TA caninas em um dos meios testados (17,75%). Em nosso estudo, as CTM-TA e CTM-MO não irradiadas apresentaram eficiências menores que tal estudo, com índices de 12,15% e 9,56%, respectivamente. Além disso, o laser não teve efeito sobre as UFC, já que as CTM irradiadas de

ambos os tecidos não apresentaram diferença significativa na eficiência de formação de colônias.

A viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripano de nosso estudo não apresentou diferenças entre os grupos dentro de cada tecido. A viabilidade celular não diferiu entre os tecidos no estudo de Uranio *et al.* (2014), no qual foram utilizadas CTM da matriz do cordão umbilical e da membrana amniótica. No entanto, diferiu dentro dos grupos, em diferentes passagens, tendo diminuído a viabilidade a partir da quarta e quinta passagens para a membrana amniótica e o cordão umbilical, respectivamente. Mesmo assim, os valores absolutos continuaram relativamente altos. Nas primeiras passagens, as CTM da membrana amniótica apresentaram viabilidade de 92,83% e as do cordão umbilical de 71,40%, valores um pouco inferiores aos encontrados nas CTM-TA de nosso trabalho, com viabilidades entre 98,29% e 98,64%, e semelhantes às das CTM-MO, com 91% a 95,82%.

Um estudo comparou as CTM-TA caninas com fibroblastos, e concluiu que a viabilidade foi maior e o índice de apoptose foi menor nas CTM-TA. Porém, ambos os tipos celulares tiveram viabilidade acima dos 90% (OH *et al.*, 2012).

Pode-se utilizar o ensaio de citometria de fluxo com anexina V-FITC e o IP para avaliação da viabilidade ou morte celular. Este método permite a discriminação entre células apoptóticas e necróticas (BURAVKOVA *et al.*, 2013).

Quando comparadas as células viáveis, em apoptose precoce, tardia e necróticas entre os grupos dentro de cada tecido, não foram verificadas diferenças significativas.

Um trabalho avaliou a apoptose de CTM-MO de cães da raça beagle e encontrou índices de 4,95% de CTM em apoptose precoce e 1,89% de CTM necróticas (LU *et al.*, 2013).

Estudos sugerem que o transplante alogênico de CTM poderia não ser rejeitado na ausência de imunossupressão e testes em modelos animais têm fornecido evidências a favor desta hipótese (ZAGO e COVAS, 2006). Esta hipoinmunogenicidade tem grandes implicações na terapia alogênica e existem muitos relatos descrevendo o uso clínico de células alogênicas com pouca

evidência de rejeição imune pelo hospedeiro ou doença do enxerto contra hospedeiro (BARRY e MURPHY, 2004).

Tal imunogenicidade baixa é devido à ausência do antígeno leucocitário de classe II (MHC-II) e de moléculas co-estimulatórias como o CD40, CD80 e CD86 (BONAB *et al.*, 2007). Como as CTM de outras espécies, as CTM caninas não expressam MHC-II quando não estimuladas. No entanto, o estímulo com mediadores inflamatórios, como interferon gama e/ou fator de necrose tumoral alfa, podem induzir as CTM a expressar MHC-II, moléculas co-estimulatórias e atuarem como células apresentadoras de antígenos (KOL *et al.*, 2014). Estudos já demonstraram a presença de expressão do MHC-I (KAMISHINA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2013) e a ausência de expressão de MHC-II nas CTM-TA (LEE *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2013), CTM-MO (KAMISHINA *et al.*, 2006), CTM do sangue (SEO *et al.*, 2009) e da matriz do cordão umbilical e da membrana amniótica canina (URANIO *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho, tivemos baixa expressão de MHC-II, porém não apresentou diferenças entre os grupos dentro de cada tecido. Esta baixa expressão pode ser devido aos cultivos não serem compostos exclusivamente por CTM, visto que somente a propriedade de aderência ao plástico não é suficiente para a purificação dos cultivos das CTM (BARRY e MURPHY, 2004). Um estudo verificou a expressão de MHC-II em uma pequena população da fração vascular estromal de cães (10,5%), a qual diminuiu uma vez que as células foram cultivadas (KIEFER *et al.*, 2014).

A estabilidade cromossômica também é um fator crítico para determinar a segurança e qualidade das células-tronco (OCK *et al.*, 2013). Alguns relatos têm mostrado que existe instabilidade cromossômica e transformação espontânea em CTM derivadas de diferentes tecidos mantidas em cultivo por longos períodos (ROSLAND *et al.*, 2009).

Assim, realizamos a análise do cariótipo nas células irradiadas e não irradiadas de ambas as origens teciduais em nosso estudo, não encontrando nenhuma alteração estrutural ou numérica de cromossomos.

Em um estudo que utilizou três fontes de laser de diferentes comprimentos de onda, foi verificado que os laser verde e azul induziram a degradação de

cromossomos humanos, enquanto que o laser vermelho de 660 nm não causou alterações (PUPPLES *et al.*, 1991).

As CTM da matriz do cordão umbilical de cães também mostraram cariótipo normal após múltiplas passagens (LEE *et al.*, 2013). Em outro estudo, as CTM da matriz do cordão e da membrana amniótica caninas não apresentaram alterações cariotípicas, indicando que a idade gestacional não afeta a estabilidade dos cromossomos durante as primeiras passagens (URANIO *et al.*, 2014). Ainda, nas células progenitoras mesenquimais de membrana amniótica, medula óssea e fígado fetal de cães também não ocorreram alterações nos cromossomos analisados em sexta passagem (WENCESLAU *et al.*, 2011). Em passagens precoces e tardias, as CTM-TA mantiveram um cariótipo diploide com 78 cromossomos (VIEIRA *et al.*, 2010).

Já no estudo de Ock *et al.* (2013), as CTM-TA, CTM-MO e CTM da pele apresentaram ploidia acima de 90%, com as CTM-TA (91%) apresentando menor índice que as CTM-MO (99,3%) e CTM da pele (99,2%). Não houve a ocorrência de CTM haploides nesse estudo, mas sim altas taxas de tetraploides, principalmente das CTM-TA (9% de CTM-TA, 0,7% de CTM-MO e 0,8% de CTM da pele) (OCK *et al.*, 2013).

CONCLUSÕES GERAIS

Com a metodologia utilizada nesse estudo, conclui-se que:

- As CTM-TA e CTM-MO caninas apresentaram as características de células mesenquimais *in vitro*, apresentando morfologia fibroblastoide com aderência ao plástico, expressaram marcadores de superfície e diferenciaram-se nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica em condições de cultivo, apresentando diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica espontânea de ambas as origens teciduais;
- As CTM de ambas as origens diferiram quanto à expressão dos marcadores de superfície. Elas tiveram alta expressão do marcador CD44, e negatividade para CD34, CD45 e CD105. No entanto, as CTM-TA apresentaram maior expressão de CD90 que as CTM-MO;

- O laser de baixa potência fosfato de índio-gálio-alumínio não alterou significativamente a proliferação e a viabilidade celular, o cariótipo e a expressão de MHC-II de CTM-TA e CTM-MO caninas nas densidades de energia utilizadas de 1,1 e 8,7 J/cm²;
- Ambas as origens de CTM apresentaram alta viabilidade e constituem fontes adequadas para obtenção das células para um futuro transplante;
- Diante do exposto, pode-se concluir que o LBP não causa efeitos biológicos às CTM-TA e CTM-MO caninas nas dosagens utilizadas. Portanto, outras dosagens devem ser investigadas para estimular a proliferação das CTM caninas sem causar alterações celulares deletérias.

BIBLIOGRAFIA (Capítulos 1 e 4)

ABEDIN, M.; TINTUT, Y.; DEMER, L.L. Mesenchymal stem cells and the artery wall. **Circulation Research**, v.95, n.7, p.671-676, 2004.

ABRAHAMSE, H.; HOURELD, N.N.; MULLER, S.; NDLOVU, L. Fluence and wavelength of low intensity laser irradiation affect activity and proliferation of human adipose derived stem cells. **Medical Technology SA**, v.24, n.2, p.15-20, 2010.

ABRAMOVITCH-GOTTLIB, L.; GROSS, T.; NAVEH, D.; GERESH, S.; ROSENWAKS, S.; BAR, I.; VAGO, R. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. **Lasers in Medical Science**, v.20, n.3-4, p.138-146, 2005.

ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; HANDRIS, P.; KLETSAS, D.; LOUKAS, S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v.1, n.8, p.547-552, 2002.

ALGHAMDI, K.M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N.A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in Medical Science**, v.27, n.1, p.237-249, 2012.

ASTOR, D.E.; HOELZLER, M.G.; HARMAN, R.; BASTIAN, R.P. Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.77, n.3, p.177-182, 2013.

ATOUI, R.; CHIU, R.C.J. Concise review: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies and unknowns. **Stem Cells Translational Medicine**, v.1, n.3, p.200-205, 2012.

BABAPOUR, R.; GLASSBERG, E.; LASK, G.P. Low-energy laser systems. **Clinics in Dermatology**, v.13, n.4, p.87-90, 1995.

BAKSHI, A.; HUNTER, C.; SWANGER, S.; LEPORE, A.; FISCHER, I. Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. **Journal of Neurosurgery**, v.1, n.3, p.330-337, 2004.

BARBA, M.; CICIONE, C.; BERNARDINI, C.; MICHETTI, F.; LATTANZI, W. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art. **Biomed Research International**, v.2013, p.1-11, 2013.

BARBOZA, C.A.G.; GINANI, F.; SOARES, D.M.; HENRIQUES, A.C.G.; FREITAS, R.A. Low-level laser irradiation induces *in vitro* proliferation of mesenchymal stem cells. **Einstein**, v.12, n.1, p. 75-81, 2014.

BARRY, F.; BOYNTON, R.E.; LIU, B.; MURPHY, J.M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. **Experimental Cell Research**, v.268, n.2, p.189-200, 2001.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **International Journal of Biochemical Cell Biology**, v.36, n.4, p.568-584, 2004.

BARTELS, K.E. Lasers in veterinary medicine – where have we been, and where are we going? **The Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v.32, n.3, p.495-515, 2002.

BAXTER, G.D.; McDONOUGH, S.M. Principles of electrotherapy in veterinary physiotherapy. In: MCGOWAN, C.M.; GOFF, L.; STUBBS, N. (Eds.). **Animal Physiotherapy: assessment, treatment and rehabilitation of animals**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. cap.10, p.182-184.

BHAKTA, S.; HONG, P.; KOC, O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v.7, n.1, p.19-24, 2006.

BONAB, M.M.; YAZDANBAKHSH, S.; LOTFI, J.; ALIMOGHADDOM, K.; TALEBIAN, F.; HOOSHMAND, F.; GHAVAMZADEH, A.; NIKBIN, B. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. **The Iranian Journal of Immunology**, v.4, n.1, p.50-57, 2007.

BOSCH, P.; PRATT, S.L.; STICE, S.L. Isolation, characterization, gene modification and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. **Biology of Reproduction**, v.74, n.1, p.46-57, 2006.

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; ISHIGURO, T.; OKUMURA, M.; IWANAGA, T.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. **Experimental Hematology**, v.32, n.5, p.502-509, 2004.

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Research**, v.319, n.2, p.243-253, 2005.

BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R. Detection of apoptosis by annexin V labeling. **Methods in Enzymology**, v.322, n.1, p.15-18, 2000.

BOURZAC, C.; SMITH, L.C.; VINCENT, P.; BEAUCHAMP, G.; LAVOIE, J.P.; LAVERTY, S. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. **Equine Veterinary Journal**, v.42, n.6, p.519-527, 2010.

BOUVET-GERBETTAZ, S.; MERIGO, E.; ROCCA, J.; CARLE, G.F.; ROCHET, N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.41, n.4, p.291-297, 2009.

BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX JR., C.S.; ARONOWSKI, J.; GROTTA, J.C.; SAVITZ, S.I. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v.30, n.1, p.140-149, 2010.

BURAVKOVA, L.B.; RYLOVA, Y.V.; ANDREEVA, E.R.; KULIKOV, A.V.; POGODINA, M.V.; ZHIVOTOVSKY, B.; GOGVADZE, V. Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, n.10, p.4418-4425, 2013.

CADDICK, J.; KINGHAM, P.J.; GARDINER, N.J.; WIBERG, M.; TERENGHI, G. Phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells differentiated along a schwann cell lineage. **Glia**, v.54, n.8, p.840-849, 2006.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I.A.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v.98, n.8, p.2396-2402, 2001.

CARVALHO, A. M.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, n.2-4, p. 303-306, 2009.

CASADO, J.G.; GOMEZ-MAURÍCIO, G.; ALVAREZ, V.; MIJARES, J.; TARAZONA, R.; BERNAD, A.; SANCHEZ-MARGALLO, F.M. Comparative

phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.147, n.1-2, p.104-112, 2012.

CASTANHEIRA, P.; TOQUETTI, L.T.; MAGALHÃS, D.R.S.; NEHEMY, M.B.; GOES, A.M. DAPI diffusion after intravitreal injection of mesenchymal stem cells in the injured retina of rats. **Cell Transplantation**, v.18, n.4, p.423-431, 2009.

CHENG, K.; KUO, T.; KUO, K.; HSIAO, C. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and current application in regeneration medicine. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, v.3, n.2, p.53-62, 2011.

CHOI, K.; KANG, B.; KIM, H.; LEE, S.; BAE, S.; KWEON, O. KIM, W.H. Low-level laser therapy promotes the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v.101B, n.6, p.919-928, 2013.

CHUNG, D.; HAYASHI, K.; TOUPADAKIS, C.A.; WONG, A.; YELLOWLEY, C.E. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. **Research in Veterinary Science**, v.92, n.1, p.66-75, 2012.

COVAS, D.T.; SIUFI, J.L.; SILVA, A.R.; ORELLANA, M.D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.9, p.1179-1183, 2003.

COVAS, D.T.; PICCINATO, C.E.; ORELLANA, M.D.; SIUFI, J.L.; SILVA JÚNIOR, W.A.; PROTO-SIQUEIRA, R.; RIZZATTI, E.G.; NEDER, L.; SILVA, A.R.L.; ROCHA, V.; ZAGO, M.A. Mesenchymal stem cells can be obtained from

the human saphena vein. **Experimental Cell Research**, v.309, n.2, p.340-344, 2005.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, v.128, n.6, p.507-520, 2007.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, n.8, p.875-884, 2000.

DEVINE, S.M.; COBBS, C.; JENNIINGS, M.; BARTHOLOMEW, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. **Blood**, v101, n.8, p. 2999-3001, 2003.

DiGIROLAMO, C.M.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY, D.G.; CLASS, R.; PROCKOP, D.J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **British Journal of Haematology**, v.107, n.2, p.275-281, 1999.

DiNICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P.D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v.99, n.10, p.3838-3843, 2002.

DISSANAYAKA, W.L.; ZHU, X.; ZHANG, C.; JIN, L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. **Journal of Endodontics**, v.37, n.8, p.1074-1080, 2011.

DMITRIEVA, R.I.; MINULLINA, I.R.; BILIBINA, A.A.; TARASOVA, O.V.; ANISIMOV, S.V.; ZARITSKEY, A.Y. Bone marrow- and subcutaneous adipose

tissue-derived mesenchymal stem cells. Differences and similarities. **Cell Cycle**, v.11, n.2, p.377-383, 2012.

DOMINICI, M.; LeBLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

FERRIELLO, V.; FARIA, M.R.; CAVALCANTI, B.N. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L-929 fibroblasts. **Journal of Oral Science**, v.52, n.1, p.33-38, 2010.

GADE, N.E.; PRATHEESH, M.D.; NATH, A.; DUBEY, P.K.; AMARPAL; SHARMA, B.; SAIKUMAR, G.; SHARMA, G.T. Molecular and cellular characterization of buffalo bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, n.3, p.358-367, 2013.

GALIBERT, F.; ANDRÉ, C. The dog: a powerful model for studying genotype-phenotype relationships. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.3, n.1, p. 67-77, 2008.

GIMBLE, J. M.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, v.5, n.5, p.362-369, 2003.

GIOVANINNI, S.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P.; NESIC, D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. **Differentiation**, v.76, n.2, p.118-129, 2008.

GROZA, I.; CĂȚANĂ, L.; PALL, E.; CENARIU, M.; POP, D.; ILEA C. Evaluation of the multilinear capacity of canine mesenchymal stem cells. **Scientific Works C Series Veterinary Medicine**, v.58, n.4, p. 198-203, 2012.

HAMBLIN, M.R.; DEMINOVA, T.N. Mechanisms of low level light therapy. **Proceedings of SPIE**, v.6140, p.1-12, 2006.

HOLLING T. M.; SCHOOTEN, E.; ELSEN, P. J. V. D. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. **Human Immunology**, v.65, n.4, p.282-290, 2004.

HOU, J.; ZHANG, H.; YUAN, X.; LI, J.; WEI, Y.; HU, S. In vitro effects of low level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.40, n.10, p.726-733, 2008.

HU, Y.; LIAO, L.; WANG, Q.; MA, L.; MA, G.; JIANG, X.; ZHAO, R.C. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.141, n.5, p.342-349, 2003.

HUANG, Y.; CHEN, A.; CARROLL, J.D.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low-level light therapy. **Dose Response**, v.7, n.4, p.358-383, 2009.

HUSS, R.; LANGE, C.; WEISSINGER, E.M.; KOLB, H.; THALMEIER, K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic adherent CD34^{-low} hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. **Stem Cells**, v.18, n.4, p.252-260, 2000.

IZADPANA, R.; JOSWIG, T.; TSIEN, F.; DUFOUR, J.; KIRIJAN, J.C.; BUNNELL, B.A. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of Rhesus macaques. **Stem Cells and Development**, v.14, n.4, p.440-451, 2005.

JAVAZON, E.H.; COLTER, D.C.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more

rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. **Stem Cells**, v.19, n.3, p.219-225, 2001.

JIN, H.J.; BAE, Y.K.; KIM, M.; KWON, S.; JEON, H.B.; CHOI, S.J.; KIM, S.W.; YANG, Y.S.; OH, W.; CHANG, J.W. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n.9, p.17986-18001, 2013.

KAMISHINA, H.; DENG, J.; OJI, T.; CHEESEMANN, J.A.; CLEMMONS, R.M. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.11, p.1921-1928, 2006.

KAMISHINA, H.; FARESE, J.P.; STORM, J.A.; CHEESEMANN, J.A.; CLEMMONS, R.M. The frequency, growth kinetics and osteogenic/adipogenic differentiation properties of canine bone marrow stromal cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal**, v.44, n.10, p.472-479, 2008.

KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.49, n.1, p.1-17, 1999.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; AFANASYEVA, N.I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.36, n.4, p.307-314, 2005.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. **Stem Cells**, v.24, n.5, p.1294-1301, 2006.

KIEFER, K.M.; PHUHAR, G.E.; CONZEMIUS, M.G.; O'BRIEN, T.D. The influence of culture medium type on cellular phenotype of canine adipose

derived stem cells. **Open Journal of Regenerative Medicine**, v.3, n.1, p.28-37, 2014.

KIM, H.; CHOI, K.; KWEON, O.; KIM, W.H. Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. **Journal of Dermatological Science**, v.68, n.3, p.149-156, 2012.

KIM, G.A.; OH, H.J.; LEE, T.H.; LEE, J.H.; OH, S.H.; LEE, J.H.; KIM, J.W.; KIM, S.W.; LEE, B.C. Effect of culture medium type on canine adipose-derived mesenchymal stem cells and developmental competence of interspecies cloned embryos. **Theriogenology**, v.81, n.2, p.243-249, 2014.

KOL, A.; FOUTOUHI, S.; WALKER, N.J.; KONG, N.T.; WEIMER, B.C.; BORJESSON, D.L. Gastrointestinal microbes interact with canine adipose derived mesenchymal stem cells in vitro and enhance immunomodulatory functions. **Stem Cells and Development**, p.1-40, 2014. doi: 10.1089/scd.2014.0128.

KUZNETSOV, S.A.; MANKANI, M.H.; BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Enumeration of the colony-forming units-fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. **Stem Cell Research**, v.2, n.1, p.83-94, 2009.

LEE, K.S.; NAH, J.; LEE, B.; LEE, H.T.; LEE, H.; SO, B.; CHA, S. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. **Research in Veterinary Science**, v.94, n.1, p.144-151, 2013.

LEE, K.S.; KANG, H.W.; LEE, H.T.; KIM, H.; KIM, C.; SONG, J.; LEE, K.W.; CHA, S. Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Research in Veterinary Science**, v.96, n.2, p.267-275, 2014.

LIAO, H.; CHEN, C.; CHEN, J. Osteogenic differentiation and ectopic bone formation of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in injectable thermo-responsive polymer hydrogel. **Tissue Engineering Part C**, v.17, n.11, p.1139-1149, 2011.

LIMA, S.A.F.; WODEWOTZKY, T.I.; LIMA-NETO, J.F.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; ALVARENGA, F.C.L. Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.5, p.463-469, 2012.

LINS, E.C.; OLIVEIRA, C.F.; GUIMARÃES, O.C.C.; COSTA, C.A.S.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. A novel 785-nm laser diode-based system for standardization of cell culture irradiation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.31, n.10, p.466-473, 2013.

LIU, G.; ZHANG, Y.; LIU, B.; SUN, J.; LI, W.; CUI, L. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. **Biomaterials**, v.34, n.11, p.2655-2664, 2013.

LU, S.; LIU, S.; ZU, Q.; XU, X.; YU, J.; WANG, J.; ZHANG, Y.; SHI, H. In vivo MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model. **Plos One**, v.8, n.2, p.1-10, 2013.

MACHADO, J.Z.; MIRANDA, A.C.S.; GONÇALVES, C.R.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Isoenzyme electrophoresis and karyotype techniques as an alternative for cell line identity confirmation. **Virus Reviews and Research**, v.19, n.1, p.1-5, 2014.

MACIAS, M.I.; GRANDE, J.; MORENO, A.; DOMÍNGUEZ, I.; BORNSTEIN, R.; FLORES, A.I. Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.203, n.5, p.9-23, 2010.

MAMBELLI, L.I.; SANTOS, E.J.C.; FRAZÃO, P.J.R.; CHAPARRO, M.B.; KERKIS, A.; ZOPPA, A.L.V.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Engineering**, v.15, n.1, p.87-94, 2009.

MANCA, M.F.; ZWART, I.; BEO, J.; PALASINGHAM, R.; JEN, L.; NAVARRETE, R.; GIRDLESTONE, J.; NAVARRETE, C.V. Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood. **Cytotherapy**, v.10, n.1, p.54-68, 2008.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; MOLLO, A.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; DECAMINADA, M.; PATRUNO, M. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Research in Veterinary Science**, v.91, n.1, p.18-24, 2011.

MEIRELLES, L.S.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **British Journal of Haematology**, v.123, n.4, p.702-711, 2003.

MENSING, N.; GASSE, H.; HAMBRUCH, N.; HAEGER, J.; PFARRER, C.; STASZYK, C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. **BMC Veterinary Research**, v.7, n.42, p.1-13, 2011.

NBAHEEN, M.; VISHNUBALAJI, R.; ALI, D.; BOUSLIMI, A.; AL-JASSIR, F.; MEGGES, M.; PRIGIONE, A.; ADJAYE, J.; KASSEM, M.; ALDAHMAH, A. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.9, n.1, p.32-43, 2013.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZHASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering**, v.14, n.6, p.1007-1015, 2008.

OH, H.J.; PARK, J.E.; KIM, M.J.; HONG, S.G.; RA, J.C.; JO, J.Y.; KANG, S.K.; JANG, G.; LEE, B.C. Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. **Theriogenology**, v.75, n.7, p.1221-1231, 2011.

OH, H.J.; PARK, E.J.; LEE, S.Y.; SOH, J.W.; KONG, I.S.; CHOI, S.W.; RA, J.C.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Comparison of cell proliferation and epigenetic modification of gene expression patterns in canine foetal fibroblasts and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, v.45, n.5, p.438-444, 2012.

OCK, S.; MAENG, G.; LEE, Y.; KIM, T.; KUMAR, B.M.; LEE, S.; RHO, G. Donor-matched functional and molecular characterization of canine mesenchymal stem cells derived from different origins. **Cell Transplantation**, v.22, n.12, p.2311-2321, 2013.

PATRICIO, L.F.L.; REBELATTO, C.L.K.; BROFMAN, P.R.S.; MACIEL, B.B.; BELTRAME, O.C.; BRITO, H.F.V.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Isolamento e caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.4, p.946-954, 2013.

PEISTER, A.; MELLAD, J.A.; LARSON, B.L.; HALL, B.M.; GIBSON, L.F.; PROCKOP, D.J. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. **Blood**, v.103, n.5, p.1662-1668, 2004.

PEREIRA, L.O.; LONGO, J.P.F.; AZEVEDO, R.B. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. **Archives of Oral Biology**, v.57, n.8, p.1079-1085, 2012.

PUPPLES, G.J.; OLMINKHOF, J.H.F.; SEGERS-NOLTEN, G.M.J.; OTTO, C.; MUL, F.F.M.; GREVE, J. Laser irradiation and Raman Spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light. **Experimental Cell Research**, v.195, n.2, p.361-367, 1991.

RA, J.C.; SHIN, I.S.; KIM, S.H.; KANG, S.K.; KANG, B.C.; LEE, H.Y.; KIM, Y.J.; JO, J.Y.; YOON, E.J.; CHOI, H.J.; KWON, E. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. **Stem Cells and Development**, v.20, n.8, p.1297-1308, 2011.

REQUICHA, J.F.; VIEGAS, C.A.; ALBUQUERQUE, C.M.; AZEVEDO, J.M.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.8, n.4, p.1211-1222, 2012.

REZAEI, M.; JAMSHIDI, S.; SAFFARPOUR, A.; ASHOURI, M.; SHARIFI, D.; MALAYERI, H.Z.; TAMIMI, N.; ROKN, A.R. Isolation, characterization and transduction of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (cBM-MSCs). **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v.7, n.3, p.193-199, 2013.

ROSLAND, G.V.; SVENDSEN, A.; TORSVIK, A.; SOBALA, E.; McCORMACK, E.; IMMERVOLL, H.; MYSLIWETZ, J.; TONN, J.; GOLDBRUNNER, R.; LONNING, P.E.; BJERKVIG, R.; SCHINCHOR, C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. **Cancer Research**, v.69, n.13, p.5331-5339, 2009.

ROZEMULLER, H.; PRINS, H.; NAAIJKENS, B.; STAAL, J.; BÜHRING, H.; MARTENS, A.C. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting anti-human monoclonal antibodies. **Stem Cells and Development**, v.19, n.12, p.1911-1921, 2010.

SARGAN, D.R.; YANG, F.; SQUIRE, M.; MILNE, B.S., O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A. Use of flow-sorted canine chromosomes in the assignment of canine linkage, radiation hybrid, and syntenic groups to chromosomes: refinement and verification of the comparative chromosome map for dog and human. **Genomics**, v.69, n.2, p.182-195, 2000.

SCHWARTZ, C.; LEICHT, U.; DROSSE, I.; ULRICH, V.; LUIBL, V.; SCHIEKER, M.; RÖCKEN, M. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. **Veterinary Research Communications**, v.35, n.8, p.487-499, 2011.

SCHWARTZ, C.; LEICHT, U.; ROTHE, C.; DROSSE, I.; LUIBL, V.; RÖCKEN, M.; SCHIEKER, M. Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. **Research in Veterinary Science**, v.93, n.1, p.457-462, 2012.

SEO, M.; JEONG, Y.; PARK, J.; PARK, S.; RHO, K.; KIM, H.; YU, K.; LEE, S.; JUNG, J.; LEE, Y.; KANG, K. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, v.10, n.3, p.181-187, 2009.

SHIBA, H.; TSUDA, H.; KAJIYA, M.; FUJITA, T.; TAKEDA, K.; HINO, T.; KAWAGUCHI, H.; KURIHARA, H. Neodymium-doped yttrium-aluminium-garnet laser irradiation abolishes the increase in interleukin-6 levels caused by peptidoglycan through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in human pulp cells. **Journal of Endodontics**, v.35, n.3, p.373-376, 2009.

SILVA, J.P.; SILVA, M.A.; ALMEIDA, A.P.F.; JUNIOR, I.L.; MATOS, A.P. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.28, n.1, p.17-21, 2010.

SINGH, S.; DEKA, D.; MULINTI, R.; SOOD, N.K.; AGRAWAL, R.K.; VERMA, R. Isolation, culture, in-vitro differentiation and characterization of canine adult mesenchymal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences**, p.1-10, 2014.

SPAN, L.F.R.; PENNING, A.H.M.; VIERWINDEN, G.; BOEZEMAN, J.B.M.; RAYMAKERS, R.A.P.; WITTE, T. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using annexin V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. **Cytometry**, v.47, n.1, p.24-31, 2002.

SPENCER, N.D.; CHUN, R.; VIDAL, M.A.; GIMBLE, J.M.; LOPEZ, M.J. In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. **The Veterinary Journal**, v.191, n.2, p.231-239, 2012.

TAKEMITSU, H.; ZHAO, D.; YAMAMOTO, I.; HARADA, Y.; MICHISHITA, M.; ARAI, T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. **BMC Veterinary Research**, v.8, n.150, p.1-9, 2012.

TIMBERLAKE, G.T.; ENWEMEKA, C.S. An inexpensive, automated instrument for laser irradiation of cultured cells. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, n.3, p.233-239, 2004.

TIZARD, I. R. MHC: The antigen-presenting receptors. In:_____. **Veterinary Immunology: an introduction**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2000. cap.6, p.47-57.

THARASANIT, T.; PHUTIKANIT, N.; WANGDEE, C.; SOONTORNVIPART, K.; TANTRAJAK, S.; KAEWAMATAWONG, T.; SUWIMONTEERABUTR, J.; SUPAPHOL, P.; TECHAKUMPHU, M. Differentiation potentials of canine bone marrow mesenchymal stem cells. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v.41, n.1, p.79-86, 2011.

TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.39, n.4, p.373-378, 2007.

URANIO, M.F.; DELL'AQUILA, M.E.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; VENTURA, M.; CATACCIO, C.R.; MARTINO, N.A.; VALENTINI, L. Characterization and in vitro differentiation potency of early-passage canine amnion- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age. **Molecular Reproduction and Development**, p.1-13, 2014.

VACANTI, V.; KONG, E.; SUZUKI, G.; SATO, K.; CANTY, J.M.; LEE, T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. **Journal of Cellular Physiology**, v.205, n.2, p.194-201, 2005.

VELOSO, M.N.; MION, W.; GOVONE, A.B.; MIRANDA, J.R.A.; LIMA-NETO, J.F.; MAIA, L.; PAVÃO, G.D.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Led Irradiation effect in mesenchymal stem cells in vitro. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**, v.13, n.2, p.167-170, 2011.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v.184, n.1, p.39-51, 1995.

VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B.E.; ZATZ, M. Isolation, characterization and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v.19, n.3, p.279-289, 2010.

VILLIERS, J.A.; HOURELD, N.N.; ABRAHAMSE, H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.7, n.4, p.869-882, 2011.

VOLK, S.W.; WANG, Y.; HANKENSON, K.D. Effects of donor characteristics and ex vivo expansion on canine mesenchymal stem cells properties: implications for MSC-based therapies. **Cell Transplantation**, v.21, n.10, p.2189-2200, 2012.

WAKITANI, S.; SAITO, T.; CAPLAN, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. **Muscle and Nerve**, v.18, n.12, p.1417-1426, 1995.

WENCESLAU, C.V.; MIGLINO, M.A.; MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E.; LIZIER, N.F.; PIGNATARI, G.C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue Engineering**, v.17, n.17-18, p.2165-2176, 2011.

YANG, H.; GAO, L.; AN, Y.; HU, C.; JIN, F.; ZHOU, J.; JIN, Y.; CHEN, F. Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. **Biomaterials**, v.34, n.29, p.7033-7047, 2013.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

ZHANG, N.; DIETRICH, M.A.; LOPEZ, M.J. Canine intra-articular multipotent stromal cells (MSC) from adipose tissue have the highest in vitro expansion rates, multipotentiality, and MSC immunophenotypes. **Veterinary Surgery**, v.42, n.2, p.137-146, 2013.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N.M.; BUENO, D.F.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; AMBRÓSIO, C.E.; PASSOS-BUENO, M.R.; MIGLINO, M.A.; ZATZ, M. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. **Stem Cells and Development**, v.19, n.3, p.395-402, 2010.